

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/05422 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international: 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):  
**BIOMERIEUX STELHYS [FR/FR]**; Chemin de L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): **ROECKLIN, Dominique [FR/FR]**; 14 Rue de la Paix, F-67500 Niederschaeffolsheim (FR). **KOLBE, Hanno [FR/FR]**; 6

Rue des Tuiliers, F-67204 Achenheim (FR). **CHARLES, Marie-Hélène [FR/FR]**; 3 Allée de la Lamperte, F-69420 Condrieu (FR). **MALCUS, Carine [FR/FR]**; 9 Rue des Ronzières, F-69530 Brignais (FR). **SANTORO, Lyse [FR/FR]**; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les Bains (FR). **PERRON, Hervé [FR/FR]**; 15 Rue de Boyer, F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire: **DIDIER, Mireille**; Cabinet Germain et Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatic protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saponin B.

WO 01/05422 A2

(57) Abrégé: Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatische de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saponine B.



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée:**

- *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**UTILISATION DUN POLYPEPTIDE POUR DETECTER, PREVENIR OU  
TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE  
DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE**

5           La présente invention concerne notamment l'utilisation d'au moins un polypeptide, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique.

10         Selon l'invention, on entend par maladie dégénérative, une maladie dans laquelle un processus de mort cellulaire ou de destruction cellulaire est associé à des troubles physiologiques et/ou cliniques. La maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson sont classées parmi les maladies neurodégénératives. On entend par maladie auto-immune, une hyperréactivité du système immunitaire vis à vis d'un ou de plusieurs auto-antigène(s). La sclérose en plaques (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux sont classés 15 dans les maladies auto-immunes.

20         La sclérose en plaques est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

25         Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus lésionnel.

L'étiologie de la SEP est source d'un débat d'actualité car la maladie pourrait avoir des origines diverses. Des hypothèses ont été émises sur une origine bactérienne et/ou virale. Par ailleurs, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859, H. Perron et al. ont été conduits à rechercher un ou des agents effecteurs du processus pathogénique aboutissant à la formation typique de plaques de démyélinisation et à une gliose astrocytaire. Dans le cadre de cette étude, ils ont mis en évidence la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de patients SEP d'au moins un facteur qui présente une activité toxique vis à vis des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires humaines ou animales. Cette activité toxique se caractérise par une désorganisation cytomorphologique du réseau de filaments intermédiaires et/ou une dégradation des protéines desdits filaments et/ou une mort cellulaires par apoptose des cellules gliales. Ils ont établi une corrélation significative entre la détection *in vitro* de cette activité toxique dans des échantillons de LCR et de sérum de patients SEP et la sclérose en plaques par un dosage colorimétrique quantitatif au bromure de méthyltétrazolium (MTT) des cellules vivantes, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859. Par ailleurs, C. Malcus-Vocanson et al. ont montré que l'urine est un fluide biologique très favorable pour la détection de

l'activité de ce facteur toxique et développé un procédé utilisant la cytométrie de flux pour détecter et/ou quantifier les cellules gliales adhérentes mortes par apoptose. Toutes les informations concernant ce procédé sont décrites dans la demande de brevet WO 98/11439, dont le contenu est incorporé à titre de référence.

5 Des essais ont été réalisés à partir d'une fraction protéique de LCR et d'urine de patients SEP pour tenter d'identifier ce facteur toxique. Le contenu protéique de chaque fraction a été séparé sur gel SDS-PAGE 12 % et observé après coloration du gel à l'argent. Parmi les protéines observées, une fraction protéique centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 21 kD a été trouvée  
10 minoritairement associée à l'activité toxique détectée *in vitro* et une fraction centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD a été trouvée majoritairement associée à cette activité toxique.

15 Une injection de la fraction provenant de LCR de patients SEP dans le cerveau de rat Lewis et une observation histologique post-mortem de coupes de cerveau des rats a permis d'observer, trois mois après l'injection, une apoptose de la population astrocytaire et la formation de plaques de démyélinisation. Toutes les informations sont contenues dans la demande de brevet WO 97/33466, dont le contenu est incorporé à titre de référence. Ces observations sont conformes à celles qui ont pu être faites sur des coupes de cerveau de patients atteints de SEP, après biopsie (N.  
20 Benjelloun et al. Cell. Mol. Biol., 1998, 44 (4), 579-583).

Les présents inventeurs ont maintenant identifié et analysé les protéines associées à cette activité toxique vis à vis des cellules gliales dans des échantillons biologiques de patients SEP, en particulier dans l'urine, le liquide céphalo-rachidien et le sérum.

25 Après purification des protéines et séparation sur gel SDS-TRICINE, les inventeurs ont mis en évidence la présence de quatre bandes d'intérêt de différents poids moléculaires apparents, respectivement de 8, 14, 18 et 20 kD correspondant à au moins cinq familles de protéines différentes. Les protéines de ces familles ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie  
30 dans les banques de données (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Basic Blast Search, Protein Blastp, les séquences protéiques sont entrées en format FASTA dans la base de données nr, l'algorithme utilisé est Matrix BLOSUM62, l'identité dénommée

“ Identities ” correspond au nombre d’acides aminés identiques donné en pourcentage et la positivité “ Positives ” correspond aux acides aminés présentant une équivalence biologique selon les paramètres susmentionnés du logiciel donnés en pourcentage). Ces protéines appartiennent aux familles des protéines du Perlecan, du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine B. Plus précisément, les protéines sont (i) pour la bande de 20 kD le fragment C-terminal du Perlecan qui commence à l’acide aminé 3464 et se termine à l’acide aminé 3707 (Murdoch AD et al. J Biol Chem, 1992, April 25 ;267 (12) :8544-47), et référencé dans l’identificateur de séquences SEQ ID N° 2 (la protéine entière Perlecan étant référencée en SEQ ID N°1), (ii) pour la bande de 20 kD le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (Monaco HL et al., Science, 1995, 268 (5213) :1039-1041) dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, (iii) pour la bande de 18 kD le précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 (Furst W et al., Euro J Biochem, 1990, Sep 24 ; 193(3) :709-14) identifié en SEQ ID N° 8, (iv) pour la bande de 14 kD la calgranuline B (Lagasse E et al., Mol Cell Biol, 1988, Jun ;8(6) :2402-10) identifiée en SEQ ID N° 17 et (v) pour la bande de 8 kD la saposine B (Kleinschmidt T et al., Biol Chem Hoppe Seyler, 1988, Dec ;369(12) :1361-5) représentée en SEQ ID N° 24. Ils ont par ailleurs mis également en évidence la présence de séquences variantes auxdites séquences de référence, en particulier pour la bande de 18 kD une séquence variante du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 référencée SEQ ID N° 9. Ces séquences protéiques variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines ou sont le résultats de phénomènes d’épissage. Il est à noter par exemple que la calprotectine est un variant de la calgranuline B.

Le fragment C-terminal de la protéine Perlecan (SEQ ID N° 2) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 69, en tenant compte du code génétique. La protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 70, en tenant compte du code génétique. La protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique. Les peptides FSWDNCFEGK DPAVIR et YSLPKSEFAV PDLELP issus du polypeptide muté activateur du GM2 (SEQ ID N°9) sont codés par les

séquences nucléotidiques ADN SEQ ID N° 66 et SEQ ID N° 67 respectivement, en tenant compte du code génétique. La protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique. La protéine saposine B (SEQ ID N° 24) est codée par exemple par la 5 séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique.

Par famille de protéines on entend l'ensemble des protéines codées à partir d'un même gène d'ADN et qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage alternatif ce qui conduit à la traduction de différentes séquences primaires 10 de protéines. Toutes ces protéines appartiennent à une même famille protéique. On inclut également dans le terme "famille protéique", les protéines qui présentent au moins 70% d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec une séquence protéique de référence de la famille.

On entend par multi-épissage, un épissage intervenant au moins une fois 15 dans la région nucléotidique d'intérêt.

Par exemple, par famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragment de protéines de séquence SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents 20 cadres de lecture.

Par exemple, par famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, et les protéines codées 25 par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID 30 N° 22, SEQ ID N° 23, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Les protéines MRP14 (SEQ ID N° 17) et MRP8 (SEQ ID N°

18) ont une séquence protéique différente tout en étant codées par un même gène ; elles appartiennent à la même famille protéique.

Par exemple, par famille de protéine saposine B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ 5 ID N° 29, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par famille d'acides nucléiques codant pour une protéine on entend 10 l'ensemble des séquences nucléiques ADNc et/ou ARN transcrits à partir d'un même gène ADN et, qui résultent d'un multi-épissage différentiel. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage différentiels et conduit à la synthèse de différents acides nucléiques (ADNc, ARN) de séquences différentes. Toutes ces séquences ADNc 15 et ARNm sont considérées comme appartenant à une même famille d'acides nucléiques.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquence SEQ ID N° 30.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de 20 protéine activatrice du GM2, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de 25 protéine calgranuline B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID 30 N° 49, SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine saposine B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragment de séquences SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par « épissage » on entend un mécanisme d'excision des introns et de raboutage des exons au cours de la maturation des transcrits et par “épissage différentiel ” on entend l'existence de plusieurs schémas d'épissage d'un transcript primaire aboutissant à la formation de différents ARN messagers et, pouvant donner lieu à la synthèse de plusieurs protéines différentes (Kaplan et Delpech, Biologie Moléculaire et Médecine, 1993, 2<sup>ème</sup> édition, Médecine et Sciences, Flammarion, pages 73-77). CE phénomène est largement décrit dans la littérature scientifique. A titre d'exemple, on peut citer le modèle des gènes qui codent pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, le modèle du gène de la dystrophine, le modèle du gène de l'alpha amylase, le gène de la myéline, etc...

Il est connu que les gènes eucaryotes, notamment, comprennent des régions (exons) qui codent pour des fragments de la protéine codée par ledit gène et d'autres régions (introns) qui n'ont pas d'équivalent protéique. Ceci est dû au fait que les gènes sont d'abord transcrits en un ARN “ primaire ” qui est ensuite coupé par des enzymes d'épissage au niveau de sites nucléotidiques spécifiques (sites d'épissage). Ces enzymes rabotent ensuite les régions codant pour la protéine, reconstituant ainsi un ARN “ secondaire ” dont les régions introniques ont été éliminées. Par ailleurs, selon les phénotypes cellulaires (et donc les tissus ou la différenciation) ces enzymes ne sont pas toutes exprimées et, ainsi, un même ARN peut être épissé différemment dans les cellules d'un même individu, générant ainsi des protéines avec des différences de séquence. Cependant, ces phénomènes peuvent aussi s'appliquer à des régions nucléotidiques qui sont entièrement codantes (exons), mais qui, selon différents épissages possibles vont générer plusieurs protéines différentes à partir de la même région nucléotidique, par phénomène d'épissage différentiel entre les différents produits protéiques.

De plus, il est connu que des régions nucléotidiques peuvent avoir plusieurs cadres de lecture selon les trois trames potentielles du code génétique. Ainsi,

la présence de plusieurs codons initiateurs de traduction dans plusieurs phases de lecture et/ou un épissage d'ARN primaire raboutant des séquences nucléotiques présentes dans des phases de lectures différentes sur l'ADN, permet à une même région ADN de générer des produits protéiques sans rapports entre eux, du point de vue de la séquence peptidique.

Enfin, le polymorphisme génétique existant entre les individus d'une même espèce et/ou des mutations individuelles peuvent créer ou supprimer des sites d'épissage dans une région ADN donnée et, ainsi, modifier la séquence et la structure du ou des produits protéiques normalement produits par cette région.

Ainsi, la combinaison de ces différents phénomènes peut permettre qu'une même séquence nucléotidique correspondant à un segment d'ADN, identifiée comme déterminant une région génétique d'intérêt dans une étude donnée, comprenne l'information nécessaire et suffisante pour définir toute une famille d'ARN épissés selon des schémas différentiels et alternatifs, dans des cadres de lecture divers et, par là évidemment, de protéines et de polypeptides ayant des séquences "mosaïques" selon un cadre de lecture voire selon les trois cadres potentiels et des mutations éventuellement liées au polymorphisme génétique.

Un exemple de ce phénomène peut être représenté par la région nucléotidique du gène *env* du rétrovirus HIV-1. En effet, plusieurs protéines différentes sont codées par des segments de la même séquence : par exemple, la glycoprotéine d'enveloppe, et les protéines régulatrices TAT, REV, NEF, VIF.

Il est encore connu que des protéines peuvent résulter de l'assemblage de sous-unités identiques (homodimères, homomultimères) ou différentes (hétérodimères, hétéromultimères). Ainsi, les différents produits protéiques codés par une même région ADN peuvent aussi s'assembler entre eux pour constituer des entités protéiques complexes multimériques. Ce phénomène s'ajoute aux précédents et, lorsqu'une protéine est identifiée par un fragment peptidique, on peut logiquement identifier tous les autres éléments constitutifs de cette protéine complexe et les segments ADN et ARN épissé qui les codent, ainsi que tous les membres de la famille de produits protéiques et leurs assemblages.

Un autre exemple est fourni par la région d'ADN humain codant pour la famille de protéines MRP14 ou calgranuline B, MRP8, calprotectine, psoriasine etc...

Aussi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une

composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID  
5 N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui  
10 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur  
15 de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Dans des modes de réalisation particuliers au moins deux polypeptides précités sont utilisés en combinaison pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

20 L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2 , SEQ ID N° 4, SEQ ID  
25 N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées. Avantageusement les cinq polypeptides qui répondent à la définition précédente sont  
30 utilisés en combinaison.

De préférence, la séquence peptidique dudit polypeptide comprend, ou consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

L'invention concerne encore l'utilisation d'au moins un fragment d'un des polypeptidiques précités pour la préparation d'un peptide immunogène, ledit peptide comprenant tout ou partie d'au moins une des séquences référencées SEQ ID N°s 58 à 65 et étant utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux.

L'invention a également pour objet, l'utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 ET SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques ci dessus, et les fragments complémentaires desdits fragments, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Il est à la portée de l'homme du métier de déterminer les séquences nucléiques des fragments nucléotidiques à partir des séquences peptidiques et du code génétique, ceci faisant partie de ses connaissances générales.

De préférence, ledit fragment nucléotidique code pour une protéine qui à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N°s 1 à 8 et SEQ ID N°s 10 à 29 précitées, et parmi les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique tel que défini ci dessus pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

Par ligand, on entend toute molécule susceptible de s'associer au polypeptide, tel que un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique, une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp. 449-454 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux.

Par ligand, on entend également toute molécule susceptible de s'associer à un fragment nucléotidique, tel qu'un fragment nucléotidique partiellement ou

5 totalement complémentaire, un polynucléotide complémentaire, un anticorps anti-acides nucléiques. La production de fragments nucléotidiques ou de polynucléotides fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes de restriction, et la synthèse chimique sur synthétiseur automatique, par exemple sur des synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystem. Par ailleurs, on connaît des techniques pour la production d'anticorps anti-acides nucléiques. On peut citer à titre d'exemples Philippe Cros et al., Nucleic Acids Researc, 1994, Vol. 22, N°. 15, 2951-2957 ; Anderson, W.F. et al. (1988) Bioessays, 8  
10 (2), 69-74 ; Lee, J.S. et al. (1984) FEBS Lett., 168, 303-306 ; Malfoy, B. et al. (1982) Biochemistry, 21(22), 5463-5467 ; Stollar, B.D. et al., J.J. (eds) Methods in Enzymology, Academic Press, pp. 70-85 ; Traincard, F. et al. (1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91 et Traincard, F. et al. (1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38).

15 L'invention a encore pour objet un procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique dans lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N°  
20 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Ledit ligand est avantageusement un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur,

un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

De même, l'invention concerne un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N°s 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Le ligand est toute molécule qui répond aux conditions précédemment décrites.

De préférence, dans les procédés décrits ci dessus la séquence du polypeptide comprend ou consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 précédentes et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

L'invention concerne également un nouveau polypeptide qui comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment présentant au moins une mutation, en particulier au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Le polypeptide est

avantageusement choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPAVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

En particulier, ledit polypeptide comprend ou consiste en SEQ ID N° 9.  
5 Ce polypeptide est utilisé pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini précédemment.

L'un des objets de l'invention est également un fragment nucléotidique qui  
10 code pour le fragment de la protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment de ladite protéine présentant au moins une mutation, en particulier deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Ledit fragment nucléotidique, en particulier, comprend ou consiste en un fragment qui code pour SEQ ID N° 9. Ce fragment est utilisé pour obtenir une composition diagnostique,  
15 pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment.

L'invention a aussi pour objet un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins le polypeptide qui comprend ou consiste en SEQ ID N° 9 ou un mélange de polypeptides comprenant ce polypeptide et au moins un polypeptide tel que décrit ci dessus, puis on détecte la formation d'un complexe ou de complexes entre le ou les polypeptides et le ou les ligands correspondants ; étant entendu que par ligand on entend une molécule  
25 qui répond aux conditions précitées.

L'invention concerne également un procédé pour détecter au moins le polypeptide référence SEQ ID N° 9 ou un fragment dudit polypeptide, ce fragment comprenant au moins une et de préférence deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N°8, dans un échantillon biologique selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. La définition de ligand correspond à celle définie précédemment. Il peut s'agir entre autres d'un

anticorps monogonal , d'un anticorps polyclonal, d'un substrat d'activité enzymatique, ou d'une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur, d'un récepteur.

On peut également mettre en contact l'échantillon biologique avec un ligand spécifique du polypeptide référence SEQ ID N°9 et au moins un ligand 5 spécifique d'au moins un autre polypeptide tel que défini précédemment, puis on détecte la formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides ; étant entendu que par ligand on entend une molécule qui répond aux conditions décrites précédemment.

Un autre objet de l'invention est un fragment nucléotidique codant pour 10 tout ou partie du polypeptide SEQ ID N° 9, et son utilisation pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment, et les fragments complémentaires 15 desdits fragments.

Par fragment polypeptidique, on entend au moins tout ou partie de la séquence peptidique d'une protéine, en particulier un fragment polypeptidique qui comprend environ entre 5 et 15 acides aminés et plus précisément environ entre 5 et 10 acides aminés et 6 et 15 acides aminés. Et par fragment nucléotidique, on entend au 20 moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique, étant entendu que par séquence nucléotidique, sont couvertes les séquences ADN et ARN.

En particulier, par fragment polypeptidique ou nucléotidique, on entend soit des fragments associés à une même unité moléculaire, soit des fragments dans un complexe moléculaire comprenant plusieurs sous-unités homologues ou hétérologues 25 obtenues de manière naturelle ou artificielle, notamment par multi-épissage différentiel ou par synthèse sélective.

L'invention concerne aussi un procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini précédemment, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après 30 purification dudit échantillon de fluide biologique, on analyse par spectrométrie de

masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

La présente invention concerne également l'utilisation *d'au moins* un polypeptide de l'invention pour définir des agents efficaces thérapeutiquement, et  
5 l'utilisation de ces agents pour prévenir et/ou traiter une maladie auto-immune et/ou neurologique et/ou dégénérative, en particulier la sclérose en plaques.

Ainsi, d'autres objets de l'invention sont les suivants :

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite protéine étant  
10 choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23,  
15 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison  
20 au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour définir un matériel biologique pour la préparation d'une  
25 composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ

5 ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlacan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine ;

10 Selon une variante avantageuse de l'une des utilisations précédentes, le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 ;

15 - Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ  
20 ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlcan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

25 - Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent ;

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent.

Avantageusement, ledit fragment nucléotidique utilisé code pour ladite protéine.

De préférence, la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du

précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saponine B. Les polypeptides sont préférentiellement choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

La séquence nucléique est de préférence choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

- Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Par efficacité thérapeutique, on entend le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue d'une amélioration, voire

d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques, et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien, analyse de potentiels évoqués et le test de détection de gliotoxicité appelé bio-essai, dont le principe est décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 précédemment citée. Cette diminution des signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Eléments de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques.

On entend par composition à usage prophylactique et/ou thérapeutique, toute composition qui comprend un agent thérapeutiquement efficace. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative l'activité biologique et/ou la fonction des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, de préférence l'activité gliotoxique et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression de ces protéines et/ou (iii) de diminuer la concentration de ces protéines dans un compartiment extracellulaire et/ou intracellulaire, et/ou de substituer une forme non pathogène à une forme pathogène, par exemple mutée, d'une de ces protéines et/ou de moduler leur fixation à au moins un de leur ligand ; ledit ligand étant une molécule qui répond aux critères précédemment décrits. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant les approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques définis à partir des protéines d'intérêt identifiées dans cette présente invention sont décrits ci-dessous. Leur activité ou efficacité prophylactique et/ou thérapeutique est évaluée *in vitro* et/ou *in vivo*.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique *in vitro* : des échantillons d'urine d'individus sains et de patients atteints de la sclérose en plaque, de préférence en phase active, sont testés pour leur activité gliotoxique *in vitro* en suivant le protocole du bio-essai décrit dans la demande de brevet WO 98/11439, précédemment citée. L'expérience est réalisée en parallèle en ajoutant ou non dans les échantillons d'urine testés l'agent thérapeutique dont l'efficacité est à tester. Des essais sont réalisés à différentes concentrations de cet agent, et après différents temps

d'incubation avec l'échantillon, à une température d'environ 37°C ou à température ambiante, pour chaque concentration d'agent testé, avant la réalisation du test bio-essai. L'activité gliotoxique est déterminée pour chaque échantillon brut ou purifié d'urine témoin et de patient en présence ou en absence de l'agent thérapeutique testé. Un agent prophylactique et/ou thérapeutique pour la sclérose en plaques est un agent qui permet une diminution ou une inhibition de l'activité gliotoxique dans un fluide biologique des patients, en particulier dans l'urine. Cette diminution ou inhibition est évaluée par rapport à l'activité gliotoxique détectée dans le fluide biologique des patients SEP en absence de l'agent testé qui fixe la borne supérieure et par rapport à l'activité gliotoxique détectée dans l'urine d'individu sain qui détermine la borne inférieure (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents peuvent être évaluée en combinaison dans un même essai.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique utilisant un modèle animal : à un animal sont injectées des fractions d'urine purifiée et/ou au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins une protéine obtenue par recombinaison génétique qui correspond à au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins un polypeptide de synthèse dont la séquence en acides aminés correspond à la séquence d'au moins un polypeptide de l'invention. Les injections sont effectuées, à différentes concentrations établies, à des animaux mammifères, tels que souris ou rat, de préférence un rat Lewis selon le protocole décrit dans la demande de brevet WO97/33466 citée précédemment. A des séries d'animaux sont injectées, par voie intradermique, intraveineuse, intrathécale, intracérébrale, intramusculaire, ou autres, différentes concentrations d'une fraction d'urine brute ou purifiée ou d'au moins un polypeptide et/ou une protéine, tels que définis ci-dessus. Un contrôle négatif est effectué en parallèle. L'agent prophylactique et/ou thérapeutique à évaluer et ensuite injecté à différentes concentrations et par différentes voies d'administration à un animal mammifère, de préférence à une souris ou à un rat. Les injections sont réalisées en une seule dose ou en doses répétées, avec différents temps d'intervalle entre chaque administration. Quelques heures à quelques semaines après l'administration, des

échantillons biologiques, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien, de l'urine sont prélevés. Sur ces échantillons sont réalisés :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai, et/ou
- (ii) une mesure d'activité des polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention,  
5       seuls ou en combinaison comme décrit au moins dans : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ;Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al.,1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ;  
10      Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- (iii) un dosage des polypeptides et/ou protéines d'intérêt, seuls ou en combinaison, par ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbant Assay) et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins un des polypeptides et/ou protéines de l'invention, ou leur fragment, et/ou
- 15      iv) un dosage d'anticorps spécifiques des polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, seuls ou en combinaison ou le dosage d'au moins un ligand capable de se fixer aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les polypeptides et protéines d'intérêt ou leurs fragments et tout peptide immunogène dérivant de ces polypeptides, protéines et fragments, en réalisant, par exemple, un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T “ helper ” spécifiques de l'antigène administré ; en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al.,1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque  
20      l'on veut évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale pour la mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer et/ou pronostiquer un état pathologique potentiel en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par le patient contre l'antigène, les polypeptides, les protéines d'intérêt ou les fragments immunogènes dérivés de ces protéines.  
25

30           Par « ligand capable de se fixer à une protéine », on entend toute molécule capable de reconnaître la protéine ou une partie de la protéine. Cela peut être vérifié par exemple *in vitro* par tests Elisa et/ou Western blot .

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'animal est ensuite sacrifié et des coupes histologiques de différents tissus sont réalisées, de préférence des coupes de cerveaux. Différentes études et observations sont réalisées pour détecter et/ou quantifier les effets caractéristiques des polypeptides et/ou protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales, et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, et/ou une démyélinisation. La présence ou l'expression des polypeptides et/ou protéines d'intérêt identifiées est également observée et/ou quantifiée dans ces tissus :

- (i) par des analyses d'immunohistologie classiques en utilisant des ligands des polypeptides et/ou protéines d'intérêt et/ou leurs fragments et/ou des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments desdits qui se lient aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt, ou à leurs fragments, et/ou
- (ii) par des techniques d'hybridation *in situ* classiques en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des oligonucléotides définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt ; et/ou
- (iii) par des techniques d'amplification par PCR et/ou RT-PCR *in situ* en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des amorces définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt.

Par anticorps capable de se fixer à un polypeptide, à une protéine ou à leurs fragments, on entend tout anticorps monoclonal ou polyclonal et tout fragment

desdits anticorps capable de reconnaître le polypeptide, la protéine ou leurs fragments. La capacité des anticorps à reconnaître lesdits polypeptides, protéines ou leurs fragments est vérifiée *in vitro*, par exemple en ELISA et/ou Western Blot. Un anticorps capable de se fixer à la protéine saposine B (SEQ ID N° 24) ou à tout fragment de cette protéine est décrit par Misasi et al. 1998, J. NeuroChem. 71 : 2313 et Klein et al. 1994, BBRC 200 : 1440-1448 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles, par exemple celles référencées précédemment pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, par immunisation à partir de la protéine naturelle, d'une protéine recombinante, d'un polypeptide de synthèse ou de leurs fragments. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-saposine B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 61 et SEQ ID N° 62.

Par exemple, un anticorps capable de se fixer à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) ou à tout fragment de cette protéine est illustré par Yuziuk *et al.*, 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles connues de l'homme de l'art. Cet anticorps peut être par exemple produit après injection à des souris ou lapin de la protéine naturelle ou tout fragment, et/ou de la protéine recombinante ou tout fragment, et/ou de peptides définis et synthétisés à partir de la séquence protéique de la protéine. Les peptides immunogènes utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux anti-GM2 sont les peptides références SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 60. Un anticorps capable de se fixer à la protéine Galgranuline B (SEQ ID N° 17) ou à tout fragment de cette protéine est décrit par Saintigny *et al.*, 1992 J Invest Dermatol 99 : 639-644 et Goebeler et al 1994 J Leukoc Biol 55 : 259-261, ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-calgranuline B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 63, SEQ ID N° 64 et SEQ ID N° 65. Un anticorps capable de se fixer à la protéine mutée activatrice du GM2 (SEQ ID N°9) ou à tout fragment de cette protéine peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles définies ci dessus.

Par protéine naturelle et fragment, on entend toute protéine isolée, purifiée totalement ou partiellement obtenue à partir d'échantillon humain ou animal et tout fragment obtenu à partir de cette protéine. Par exemple, on obtient la protéine naturelle

correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) en suivant la technique décrite par Waring et al. 1998 Mol Genet Metab 63 : 14-25 ; la protéine naturelle correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) en suivant la technique décrite par DeGasperi et al., 1989 Biochem J 260 : 777-783, Vogel et al., 1987 Arch Biochem Biophys 259 : 627-638, Mitsuyama, 1983 Hokkaido Igaku Zasshi 58 : 502-512 ; Hirabayashi et al 1983 J Neurochem 40 : 168-175, Conzelmann et al, 1979 Hoppe Seylers Z Physiol Chem 360 : 1837-1849, Li et al., 1976 J Biol Chem 251 : 1159-1163. La protéine naturelle correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) est obtenue en suivant la technique décrite par Hitomi et al. 1996 J Cell Sci 109 : 805-815, Van den Bos et al. 1998 Protein Expr Purif 13 : 313-318 et Raftery et al. 1996 Biochem J 316 : 285-293.

Par protéine recombinante ou fragment d'une protéine recombinante, on fait référence à toute protéine ou fragment de protéine produit dans une cellule procaryote ou eucaryote à partir d'une séquence nucléotidique codant pour la protéine ou son fragment et transfectée dans la cellule, cette protéine ou son fragment étant ensuite purifiée. D'une manière générale, toute cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote peut être utilisée dans le cadre de la présente invention, mais les cellules issues d'organismes eucaryotes sont préférées. On peut citer à titre d'exemple les cellules CHO, les cellules COS, les cellules Semliki. Aux fins de la présente invention, ladite cellule peut être sauvage ou mutante. Par exemple, la protéine recombinante correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) peut être obtenue en suivant les techniques décrites par Zaltash et al. 1998 Bebbs letter 423 : 1-4 et Qi et al. 1994 J Biol Chem 269 : 16746-16753. Une telle protéine recombinante est au moins disponible auprès de Kase et al. 1996 Febs Lett 393 : 74-76. La protéine recombinante correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) peut être produite par les techniques décrites par Yuzyuk et al. 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 et Bierfreund et al., 1999 Neurochem Res 24 : 295-300. La protéine recombinante correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) peut être obtenue selon le protocole de Longbottom et al. 1992 Biochim Biophys Acta 1120 : 215-222, Raftery et al. 1999 Protein Expr Purif 15 : 228-235. Une telle protéine recombinante est disponible au moins auprès de Klemp et al. 1997 Febs Letter 408 : 81-84.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N°24), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 53 ou un fragment de cette séquence. Par 5 séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N° 24), on entend toute séquence déduite de la séquence d'ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 31 ou un fragment de cette séquence. Par 10 séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN 15 codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 42 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence ou fragment nucléotidique codant pour tout ou partie de la protéine mutée (SEQ ID N° 9), on entend la séquence d'acides nucléiques déduite de la 20 séquence SEQ ID N° 9, en tenant compte du code génétique. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de cette protéine mutée B (SEQ ID N° 9), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par activité protéique, on entend une fonction caractéristique biologique 25 de la protéine. Cette activité protéique peut être mise en évidence par des techniques connues de l'homme de l'art. Par exemple, l'activité de la saposine B (SEQ ID N° 24) et des protéines de la famille de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), peut être détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634.; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591, Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 et Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159. Par activité de la

protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) et des protéines de la même famille (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Kase et al., 1996, Febs Letters 393 : 74-76, Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 et O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308. Par activité de la calgranuline B (SEQ ID N° 17) et les protéines de la même famille de la calgranuline b (par exemple SEQ ID N° 18à 23) et toute, on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Murthy et al.,1993 J Immunol 151 : 6291-6301 et Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454.

10 L'obtention d'un modèle animal transgénique, de préférence murin, pour une pathologie humaine est techniquement réalisable. Brièvement, l'animal transgénique est produit en utilisant les techniques conventionnelles décrites et possède intégré dans son génome les acides nucléiques codant pour les protéines ou leurs fragments.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique et suivi thérapeutique *ex vivo*, chez l'homme :

les agents thérapeutiques à tester pour une activité thérapeutique et/ou pour un suivi thérapeutique sont administrés par différentes voies à l'homme, telles que les voies intradermique, intraveineuse, intramusculaire, intracérébrale, orale, ou autres.  
20 Différentes doses sont administrées à l'être humain. Le dossier clinique du patient au moment de la première administration est parfaitement connu. Une ou plusieurs administrations peuvent être réalisées avec des temps d'intervalle différents entre chaque administration pouvant aller de quelques jours à quelques années. Des échantillons biologiques sont prélevés à des intervalles de temps déterminés après administration de l'agent thérapeutique, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien et de l'urine. Différentes analyses sont réalisées à partir de ces échantillons. Juste avant la première administration de l'agent thérapeutique, ces prélèvements et ces mêmes analyses sont également réalisés. Un examen clinique et biologique classique (IRM, bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien, 25 potentiels évoqués) est réalisé également en parallèle des analyses supplémentaires qui sont être décrites ci dessous, à différentes temps de l'analyse. Les analyses réalisées sont :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai à partir d'échantillons de sérum, de LCR et d'urine, et/ou
- 5 (ii) une mesure d'activité des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention seules ou en combinaison comme décrit par exemple par : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ; Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- 10 (iii) un dosage des protéines d'intérêt ou de leurs fragments, seuls ou en combinaison, dans les échantillons de sang/sérum, LCR, urine par ELISA et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins une des protéines ou à un de leur fragment, et/ou
- 15 (iv) un dosage d'anticorps spécifiques des protéines d'intérêt ou de leurs fragments dans des échantillons de sang/sérum, LCR, urine, par ELISA et/ou Western blot en utilisant une protéine naturelle ou un fragment de la protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou un fragment de cette protéine recombinante, seuls ou en combinaison. De même un dosage de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées, seules ou en combinaison, peut être réalisé, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les protéines d'intérêt et tout peptide immunogène dérivant de ces protéines, par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T spécifiques de l'antigène administré (exemple). Par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T helper spécifiques de l'antigène administré (exemple) ; Par exemple en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque l'on souhaite évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer un état pathologique potentiel chez un patient en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par ledit patient contre 20 l'antigène les protéines d'intérêt ou tout fragment immunogène dérivés de ces protéines, seuls ou en combinaison, et/ou
- 25 (vi) une détection de fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour les protéines ou un fragment des protéines d'intérêt par hybridation nucléotidique selon les techniques bien

connues de l'homme de l'art (Southern blot, Northern blot, ELOSA " Enzyme-Linked Oligosorbent Assay " (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res., 1993 Dec ; 54 (12) :2021-6 et François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)) et/ou par méthode d'amplification de l'ADN et/ou l'ARN , par exemple par PCR, RT-PCR, 5 en utilisant des fragments d'acides nucléiques codant pour la séquence des protéines d'intérêt, et/ou  
(vii) par biopsie de tissus, de préférence du cerveau, et l'observation des effets caractéristiques des protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique 10 et/ou l'observation de phénomènes de démyélinisation, et/ou  
(viii) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de la présence des protéines d'intérêt et l'estimation de leur expression par observation immunohistologique sur des coupes histologiques réalisées à partir des tissus, en utilisant des ligands et/ou des anticorps ou leurs fragments capables de se fixer aux 15 protéines d'intérêt, et/ou  
(ix) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de l'expression des protéines d'intérêt par hybridation in situ des molécules d'ARN codant pour les protéines d'intérêt en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt, et/ou  
20 (x) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), la détermination de l'expression des protéines d'intérêt par amplification de ces ARN par des techniques classiques, comme par exemple, la RT-PCR, en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le 25 fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant 30 à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à

23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

5 On désigne par séquence d'acides nucléiques ADN ou fragments codant pour les 'polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention' la séquence d'acides nucléiques codant pour le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), la séquence d'acides nucléiques codant pour le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N° 31) codant pour la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la séquence d'acides nucléique (SEQ ID N° 42) codant pour la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N°53) codant pour la saposine B (SEQ ID N° 24), les séquences d'acides nucléiques ADN et/ou ARN (SEQ ID N° 30 à 57) codant pour les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29).

10 Une protéine ou un variant d'une protéine choisie plus particulièrement parmi les séquences définies dans les identificateurs SEQ ID N°s 2, 4, 8 , 9, 17 et 24 ou leurs fragments, ou parmi les séquences correspondant aux protéines des familles de ces dites séquences (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ 15 ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 24, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison, présente un effet toxique directement ou indirectement, vis à vis de cellules, en particulier vis à vis des 20 cellules gliales, qui est mis en évidence par le bio-essai précité. Les auto-anticorps produits en réponse à la présence de cette protéine ou de ces protéines sont associés au processus auto-immun. Ainsi, la cible du ou des agent(s) thérapeutique(s) est par 25

exemple (i) la protéine naturelle ou les protéines naturelles ou leurs variants dans le but de réguler leur expression et/ou leur concentration intracellulaire et/ou leur concentration dans la circulation, (ii) un anticorps spécifique d'au moins une telle protéine. L'agent thérapeutique ou les agents thérapeutiques définis éliminent la cible 5 directement, par induction d'une réponse immunitaire spécifique et/ou la neutralisent.

La présente invention concerne donc un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de mammifères atteints de pathologies dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant :

(i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, 10 indépendamment ou en combinaison,

(ii) soit au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, 15 indépendamment ou en combinaison,

(iii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iv) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des protéines dont les séquences sont référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, en association avec des éléments assurant l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique,

(v) soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement la protéine d'intérêt ou les protéines d'intérêt ou tout fragment de cette ou de ces protéine(s) ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites protéines ou de ses fragments ladite cellule mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence d'acide nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et ARN codant pour les protéines référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines

appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la protéine d'intérêt, d'un fragment de la protéine d'intérêt ou d'un 5 anticorps spécifique de la protéine d'intérêt qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997,PNAS 94 : 14660-14665). La composition pharmaceutique peut contenir un agent thérapeutique seul dirigé contre une cible seule ou des agents pris en combinaison dirigés contre plusieurs cibles..

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le 10 fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N° 2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % 15 d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % 20 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, il est à la portée de l'homme de l'art de définir et utiliser les molécules décrites ci dessus et/ou toute molécule capable de se 25 fixer au dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber lesdites molécules. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de protéines naturelles et/ou recombinantes et/ou de polypeptides de synthèse et leurs fragments, de ligand capables de se fixer au dites protéines ou à leur(s) fragment(s), par exemple des anticorps ; de protéines inhibitrices de la fonction et/ou de l'expression et/ou de la fixation desdites 30 protéines.

Utilisation de protéine(s) et/ou peptide(s) naturel(s) et/ou de protéine(s) recombinante(s) et/ou de polypeptide(s) de synthèse correspondant aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les protéines dont les séquences en acides aminés sont référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seules ou en combinaison,

(ii) soit au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces protéines d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide cible,

(iii) soit au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences de référence SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou une combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre le polypeptide cible,

(iv) soit au moins toute protéine ou peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. L'administration de ces protéines et/ou peptides seuls ou en combinaison peut rétablir la concentration d'une protéine d'intérêt dans l'organisme.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T « helper », notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T helper), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2)

Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés  
5 a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMHI, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

La présente invention concerne l'administration d'une protéine ou d'un peptide dérivés des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) ou de leur(s) fragment(s), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur  
10 de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec  
15 l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seuls ou en combinaison, pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce que ils doivent avoir perdu leur activité毒ique, par exemple leur activité gliotoxicité, ou avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement  
20 une réponse immune médiée par les lymphocytes T ou/et les anticorps dirigée contre cette protéine sont utilisés. De telles protéines sont dites 'modifiées', cependant leur immunogénicité est conservée. De telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou  
25 emplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques ou/et recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

30 Les protéines d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 25), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), sont utilisées en vaccination prophylactique et thérapeutique contre les maladies auto-immunes, de préférence la SEP. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la protéine immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules, adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles protéines ou peptides vaccins est réalisée comme suit : les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles, recombinantes, peptides) sont analysées dans un test fonctionnel pour vérifier qu'elles ont perdues leur toxicité, par exemple leur activité gliotoxique en utilisant le test appelé bio-essai, et pour vérifier leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des

équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents "wetting" ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxyde d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

En général la concentration du polynucléotide dans la composition utilisée pour une administration *in vivo* est de 0.1 $\mu$ g /ml jusqu'à 20 mg /ml. Le polynucléotide peut être homologue ou hétérologue de la cellule cible dans laquelle il va être introduit.

La présente invention concerne également l'utilisation de vaccins incluant des molécules d'acides nucléiques qui codent pour les protéines d'intérêt ou des peptides immunogènes ou leur fragment(s), non actifs, correspondant aux protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Les vaccins d'acides nucléiques, en particulier les vaccins ADN, sont administrés généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

A partir de la séquence en acides aminés des protéines d'intérêt décrites (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23,

SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, des peptides ou des fragments correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces protéines peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondante aux protéines d'intérêt, produites dans un système cellulaire procaryote ou eucaryote, sont disponibles auprès de différentes équipes et sont décrites dans la littérature. Elles peuvent être également produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki). Les protéines recombinantes correspondant aux protéines d'intérêt ou à des fragments des protéines d'intérêt peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou encaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit a été effectué sur résine chélatée au nickel (Qiagen). La colonne a été lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution a été faite avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des protéines d'intérêt peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant.

Utilisation de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins un ligand capable de se fixer aux protéines et/ou fragments des protéines choisies parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et

24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, le ligand étant capable ou non d'inhiber l'activité protéique,

10 (ii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un de ses fragments choisie parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de 15 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Cet 20 anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment molécule capable de se fixer aux protéines cibles, par exemple les récepteurs de ce protéines, les cofacteurs de ces protéines, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux protéines ou tout fragment de ces protéines.

25 Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettent la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles 30 spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une protéine décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi

thérapeutique de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps reconnaissent le site actif de la protéine et en se fixant, inhibe la fonction de la protéine. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysé par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western blot en utilisant la protéine ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la protéine ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps, de préférence en déterminant la diminution de l'activité gliotoxique en utilisant le test bio-essai *in vitro*.

Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine cible ou une partie de cette protéine sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii) soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène est également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des protéines d'intérêt. Par exemple, l'immunogène suivant a été préparé : les peptides SEQ ID N°s 58, 59, 60 issus de la séquence du précurseur du ganglioside GM2, les peptides SEQ ID N°s 61, 62 issus de la séquence de la saposine B et les peptides SEQ ID N°s 63, 64, 65 issus de la calgranuline B ont été couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux ont été soumis à une injection de peptide-KLH ou de peptide-HSA en utilisant de l'adjvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-protéines par un test ELISA utilisant les protéines initiales. Les cellules spléniques de ces souris ont par conséquent été récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les

anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprecipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont ciblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la protéine d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la protéine d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de « CDR grafting » (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention.

Utilisation de molécules inhibitrices des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant (i) soit au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple inhibitrice de l'activité gliotoxique, (ii) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction, (iii) soit au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple un récepteur ou un cofacteur. On peut penser que ces protéines de l'organisme humain peuvent être inhibées sans effet secondaire.

5 Un autre aspect important de l'invention concerne l'identification et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de substances naturelles et/ou synthétiques (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt de l'invention et/ou de leur fragment : SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies  
10 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29 et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme tels les inhibiteurs du métabolisme correspondant, les inhibiteurs d'enzymes activées par les coenzymes, (iii) capables de réguler l'expression des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même  
15 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %  
20 d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou l'expression des ligands des protéines d'intérêt SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences  
25  
30

peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, comme par exemple des récepteurs. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques  
5 de la maladie. L'invention concerne également des méthodes pour traiter et prévenir une maladie auto-immune, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives de ces substances. Les substances peuvent être des protéines, des anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides etc... Les petites molécules peuvent être ciblées  
10 et identifiées en grande quantité en utilisant des librairies combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des carriers physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

15 Pour identifier des molécules inhibitrices de faible poids moléculaire comme des drogues candidates pour les maladies dégénératives et/ou neurologiques et/ou auto-immunes, telles que la sclérose en plaques, on utilise les tests et protocoles décrits dans précédemment et dans les demandes de brevet incorporés à titre de référence, en utilisant des échantillons prélevés du patient non traité ou traité, du modèle animal non traité ou traité, ou de tissus du modèle animal non traité ou traité.  
20 Cet aspect de l'invention inclue également un procédé pour identifier des substances capables de bloquer ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt, comprenant l'introduction de ces substances dans un test *in vitro* ou dans un modèle animal *in vivo*. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs  
25 sont aussi testés dans des essais de toxicité et pharmacocinétique pour savoir si ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les substances testées pour l'inhibition ou le blocage des activités protéiques ou de l'expression des protéines, dans ces procédures de criblage peuvent être des protéines, des anticorps, des fragments d'anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines d'intérêt, etc ..... Les petites molécules peuvent être ciblées et identifiées en grande quantité en utilisant des librairies combinatoires chimiques.

30 A titre d'exemple, on peut citer comme substances inhibitrices :

Les inhibiteurs des protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les inhibiteurs des fragments desdites protéines. Ces inhibiteurs peuvent être compris dans une composition prophylactique et thérapeutique, en particulier pour le traitement de la sclérose en plaques. Par exemple, la lycorine, alcaloïde extrait de Amaryllidaceae (ex : Crinum Asiaticum) est utilisée *in vitro* à une concentration comprise entre 0.1 et 0.5 µg /ml et *in vivo* à une concentration comprise entre 0.1 et 1 mg / kg /jour. Par exemple, le Rolipram (nom commercial) et l'Ibudilast (nom commercial), qui sont deux molécules de la même famille des inhibiteurs des phosphodiestérases 4(PDE4) sont utilisées *in vitro* à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM/l et *in vivo* à des concentrations comprises entre environ 10 mg/kg/jour.

▲ A partir des séquences d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et des séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), il est évident que l'on peut déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN (SEQ ID N° 30, 31, 42, 53) correspondant aux protéines d'intérêt et les séquences codant pour les protéines de la famille de ces protéines d'intérêt ( par exemple SEQ ID N° 32 à 41, SEQ ID N° 43 à 52, SEQ ID N° 54 à 57, SEQ ID N° 66 à 67), en tenant compte du code génétique et de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme :

- de séquences anti-sens,
- de séquences codant pour un gène thérapeutique,

- de séquences pouvant être contenue dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire ex vitro et/ou in vivo (thérapie génique).

Utilisation d'acides nucléiques déduits des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention ; acides nucléiques anti-sens et/ou codant pour un gène thérapeutique.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, en particulier la sclérose en plaques, la composition comprenant (i) soit au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), (ii) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique codant pour les protéines ou un fragment de protéines (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence nucléique.

Par séquence d'acide nucléique, on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de

synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager. Ces séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides 5 aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ 10 ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique 15 l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les acides nucléiques adaptés.

Aussi, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant 20 pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s) (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences 25 peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'invention consiste à définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques 30 complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s). Ces fragments correspondent à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que

ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. L'invention décrit l'utilisation de ces acides nucléiques capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à l'ADN ou/et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leu(s) fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une 5 combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le Tm (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui 10 présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence. Afin de réduire la proportion de peptides naturels ou variants, il est possible d'envisager une approche anti-sens et/ou 15 ribozyme. Une telle approche est largement décrite dans la littérature. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation 20 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite composition comprenant au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement 25 modifiées par ladite séquence nucléique.

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs (anti-sens ou codant pour une protéine ou un fragment d'une protéine) permettent de cibler les cellules dans lesquelles le peptide est exprimé, telles que les cellules macrophages : (i) soit par l'utilisation d'une molécule de ciblage introduite sur le vecteur, (ii) soit par l'utilisation 30 d'une propriété particulière de ces cellules.

Utilisation de vecteurs comprenant un gène d'intérêt thérapeutique correspondant aux gènes des protéine d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telles que la sclérose en plaques, la composition comprenant une séquence d'acide nucléique comprenant un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que la spermine.

10 Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que

l'edit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule,

5 (iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de  
10 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %  
15 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; les protéines inhibitrices de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %  
20 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,  
25 (iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %  
30

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps, on entend les fragments F(ab)2, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ; 5 Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-10 662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397). Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en 15 des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'amino acides (polypeptide transmembranaire) permettant l'ancre au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour undit 20 polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les 25 séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus); CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la 30 vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un

type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible 10 d'introduire des séquences nucléiques « neutres » ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des séquences requises 15 pour le transport intracellulaire, pour la réPLICATION et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas 20 possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un « vecteur », et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide

nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, 5 l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acetonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, 15 d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés.

Utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la 25 calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences 30 peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %

d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de mammifères atteint de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins un vecteur contenant un gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées dans le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfecter ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que désignés dans le paragraphe précédent, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique codant notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la

calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère ou patient porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps,

(ii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; protéine inhibitrice de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement

au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, leur(s) fragment(s) et/ou contre toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de l'expression et/ou du métabolisme desdites protéines d'intérêt, et/ou des ligands desdites protéines comme par exemple les récepteurs. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système immun, soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8), soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...).

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les CPA comme les

macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux cellules T CD4+ et CD8+, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T (Debrick et al., 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J. Ep. Med. 178 : 509 ; Kovacsics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942; Kovacsics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J. Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al., 1997, Eur. J. Immunol. 27 : 280). Pour une vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC, c'est-à-dire un gène qui code pour un polypeptide qui peut, après sa production intracellulaire et son « processing », être présenté aux cellules CD8+ et/ou CD4+ par les molécules des complexes CMHI et CMHII respectivement à la surface de ces cellules.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand comme par exemple un récepteur, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocytter ladite protéine ou ledit peptide, le « processer » de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de

l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al ; 1996, J. Biochem. 120 : 657-662. Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques d'ADNc (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéines choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites 20 séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % 25 d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide complet soit de manière préférée des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit 30 dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre

l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose 5 médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules ( $0.1\mu\text{m}$ ) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre  $0.5\ \mu\text{m}$  et environ 10  $6\ \mu\text{m}$ ) (Sallusto et al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-880). Dans cette invention, on entend par 15 cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre  $0.5\ \mu\text{m}$  et environ  $6\ \mu\text{m}$  dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de 20 façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide correspondant aux protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur 25 de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, à des ligands desdites protéines, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables 30 d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une

séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé contre une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur 5 de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec 10 l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend désigner les macrophages, 15 les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992 Immunology today 13 : 244-247 ;Brittende et al 1996, Cancer 77 :1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et 20 notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J Immunol 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene 25 therapy 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, .. ; (Kawano et al., 1998 Immunology 95 :5690-5693 ; Pessino et al., 1998 J Exp Med188 :953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al.. 1997, Immunology Today 18 : 127-135).

30 De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première

catégorie implique des techniques physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagenèse artificielle par insertion dans la cellule hôte dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al. 1995, Human Gene Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (Haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait, il a été montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules

anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA ( Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou Transfectam<sup>TM</sup> (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAP<sup>TM</sup> (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2 : 674-622) ou la Lipofectamine<sup>TM</sup>, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autres groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même « ciblé », comme décrit ci dessus.

Utilisation de cellules transformées *in vitro* ou *ex vivo* avec des vecteurs contenant un gène d'intérêt thérapeutique défini par rapport aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins une cellule, notamment une cellule ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant *in vivo* pour :

5 (i) au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et tout fragment

20 (ii) au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

25 (iii) au moins toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces protéines,

30 (iv) au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de

protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI,

(v) au moins tout anticorps et toute partie d'anticorps capables de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Par «mammifère» on entend, de préférence, un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont préférentiellement CMHII+ ou CMHII+-inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les astrocytes, les oligodendrocytes.

L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit

juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle concerne des cellules procaryotes , des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

5 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+, ..... ) du patient ou allogéniques sont placées en contact d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associé aux molécules du CMHI et/ou CMHII et ainsi induire une réponse immune spécifique contre le peptide. Les cellules « activées » sont ensuite administrées au patient chez lequel elles vont induire une réponse immune spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immune, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

10 15 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,..) sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule transformée qui vont s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immune parfaitement ciblée.

20 25 30 Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunes limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à

environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même vecteur (cette construction particulière est appelée « string of beads »). Une telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al ;, 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

5 Protocole de mise en contact des cellules et du fragment antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules CMHI repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMHI ou du CMHII pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMHI : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein 10 d'une même espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T CD4+, les 25 lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps spécifique du polypeptide cible.

30 Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrivit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées

(lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50 %, c'est-à-dire  $10^6$  cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de Ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération , les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitement préalable des cellules présentatrices de l'antigène : les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elle sont préincubées en présence de différents inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10 µM à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

8. $10^6$  cellules sont internalisées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1 µg) dans des micropuits dans 70 µl. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes sont fixés à la surface des cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70 µl de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures. Cellules et surnageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape préliminaire de préfixation des antigènes à la surface des cellules est supprimée. Les cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à 10 $^6$ cellules /ml. Les cellules sont incubées en présence d'un excès d'antigène pendant

différentes périodes à 37°C (1 µg de molécules /5.10<sup>7</sup> cellules monocytes/macrophages ou /10<sup>8</sup> cellules B-EBV).

Tous les agents thérapeutiques définis dans le cadre de la présente invention sont utilisés pour prévenir et/ou traiter une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, seuls ou en combinaison. Ils peuvent être utilisés également pour évaluer leur efficacité *in vitro* ou *in vivo*.

Administration chez l'homme des agents thérapeutiques:

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo* notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou peptide et/ou molécule et/ou cellule à transférer ou de l'organe/tissus cible.

Pour la mise en œuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature (voir, par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed. 1980, Mack Publishing Co). Ce véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau stérile, libre d'agents pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

**Figures :**

La figure 1 représente la séquence en amino acides de la protéine GM2AP, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides GM2AP.

La figure 2 représente la séquence en amino acides de la protéine MRP14, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides MRP14.

La figure 3 représente la séquence en amino acides de la protéine Saposine B, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides Saposine B.

La figure 4 représente le dosage de la protéine MRP8 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 5 représente le dosage de la protéine MRP14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 6 représente le dosage de la protéine MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 7 représente les concentrations moyennes des protéines MRP8, MRP14, MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 8 représente le dosage de la protéine GM2AP (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS

signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 9 représente le dosage de la protéine Saposine B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 10 représente la co-détection des protéines Saposine B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  - en ordonnée) et GM2AP (ng/ml - en abscisse) dans des échantillons d'urine de patients SEP, de témoins supposés sains et de patients atteints d'autres maladies neurologiques et la corrélation observée entre les taux des deux protéines.

La figure 11 représente : figure 11A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 11B le dosage de la protéine Saposine B en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 12 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en  $\text{ng} \times \mu\text{g}/\text{ml}^2$  dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 13 : figure 13A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 13B le dosage de la protéine Saposine B en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 14 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en  $\text{ng} \times \mu\text{g}/\text{ml}^2$  dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 15 représente la corrélation entre les concentrations de GM2AP en ng/ml (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 16 représente la corrélation entre les concentrations de Saposine B en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 17 représente la corrélation entre le produit des concentrations de GM2AP et Saposine B en  $\text{ng} \times \mu\text{g}/\text{ml}^2$  (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 18 représente la corrélation entre les concentrations en GM2AP (ng/ml - en ordonnée gauche), les concentrations en Saposine B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$  - ordonnée droite) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (abscisse). Deux droites de corrélation estimées sont représentées sur le graphe. Les lignes en gras sont relatives aux concentrations en saposine B ; les lignes en noir clair sont relatives aux concentrations en GM2AP.

#### Exemples :

Exemple 1 : Recueil et pool d'urines.

Des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus sains (SEP négatifs) n'ayant a priori aucune maladie neurologique ou autoimmune. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 20 litres d'urine a été constitué (pool SEP négatif). Parallèlement, des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus atteints de sclérose en plaques (SEP positifs) à différents stade de la maladie. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 80 litres d'urine a été constitué (pool SEP positif).

30

Exemple 2 : Purification des protéines urinaires.

Les pools d'urine SEP positif et SEP négatif, recueillis et testés selon l'exemple 1, ont été purifiés pour obtenir une concentration en protéines élevée et éliminer au maximum les protéines de haut poids moléculaire.

Précipitation : des précipitations au sulfate d'ammonium (Prolabo - réf. 21 5 333 365) ont été effectuées sur les pools d'urine SEP positif et SEP négatif. Le pourcentage de 60 % de sulfate d'ammonium saturé pour 40 % d'urine, soit 390 grammes de sulfate d'ammonium par litre d'urine a été utilisé. Chaque pool est réparti en fractions de 1,8 litres dans des flacons de 2 litres pour améliorer la précipitation. La précipitation a été effectuée durant 2 x 8 heures, à température ambiante, sous agitation 10 douce. Après centrifugation des pools d'urine à 3 000 tpm pendant 10 min., à une température de 10°C, le culot obtenu est repris dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl<sub>2</sub> 1 mM et de l'urée à 0,25 M. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3 000 tpm pendant 10 min. Le surnageant contient les protéines concentrées. Il est soit utilisé immédiatement pour l'étape suivante, soit congelé si l'étape suivante ne peut être 15 effectuée en continu.

Chromatographie par échange d'ions : la solution contenant les protéines a ensuite été passée sur un gel DEAE fast Flow (commercialisé par PHARMACIA). Cette étape est effectuée à basse pression sur une colonne PHARMACIA remplie de gel. Les tampons sont amenés sur la colonne par une pompe péristaltique qui permet un 20 débit régulier. Le tampon d'équilibration de la colonne est le tampon Tris 20 mM, pH 7. La fraction correspondant au surnageant de précipitation et contenant une quantité de sels trop élevée est dialysée contre ce tampon avant dépôt sur la colonne. Une élution par un gradient salin permet de récupérer les protéines. Le gradient d'élution est effectué par palier de NaCl 100, 200, 300, 500 mM dans le tampon d'équilibration de 25 la colonne. Les fractions d'élution sont testées par le test MTT et ne seront conservées que les fractions positives, soit la fraction éluée à 200 mM NaCl. Ces fractions pourront être traitées immédiatement ou conservées à l'état lyophilisé.

Purification : Une chromatographie d'exclusion stérique basée sur la différence de taille et de forme des protéines à éluer a été utilisée. La fraction correspondant à l'élution 200 mM NaCl est déposée sur la colonne. Au cours de l'élution, les protéines de faible masse moléculaire sont retenues et donc éluées plus tardivement que les grosses molécules. Les purifications ont été effectuées sur HPLC 30

avec une colonne TosoHaas TSK Prep G 3000 SW, d'un diamètre de 21,5 mm et d'une longueur de 300 mm, la limite d'exclusion en masse moléculaire est de 500 000 daltons. Le tampon d'élution utilisé contient du phosphate 100 mM, du sulfate de sodium 100 mM, à pH 6,8. La séparation du mélange de protéines a été effectué en 60 min. Seule la fraction correspondant à une masse de 15-20 000 daltons a été conservée. Cette fraction est dialysée dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl<sub>2</sub> 0,2 mM, pH 7,2, puis lyophilisée.

A chaque étape, seules les fractions présentant une activité毒ique significative ont été retenues pour l'étape suivante. Un contrôle de l'activité毒ique des protéines a été effectué à chaque étape, à l'aide du test MTT. Seules les fractions présentant une activité毒ique significative ont été retenues pour l'étape de purification supplémentaire décrite dans l'exemple 3.

Exemple 3 : Purification supplémentaire des protéines urinaires par chromatographie phase inverse.

Des pools d'urine provenant de patients SEP (pool SEP positif) et de patients non SEP (pool SEP négatif), obtenus après purification selon l'exemple 2, ont été repris dans de l'eau distillée, puis dilués avec une solution 0,2% TFA/10% acétonitrile pour obtenir une concentration finale d'environ 130 à 140 µg/ml.

La séparation par HPLC phase inverse C8 a été effectuée sur une colonne Brownlee Aquapore (nom commercial) commercialisée par la société Perkin Elmer (caractéristiques de la colonne : 300 angstroms/7 µm/(100x4,6) mm). Deux colonnes distinctes ont été utilisées respectivement pour les pools positif et négatif. Les injections ont été réalisées par multi-injections de 250 µl. Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 5% à 15% de tampon B en 5 min., puis de 15% à 100% de tampon B en 95 min., à un débit de 0,5 ml/min. Les tampons de séparation A et B utilisés sont respectivement le tampon 0,1% TFA (Pierce n° 28904)/ eau MilliQ et le tampon 0,09% TFA/80% acétonitrile (Baker). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance UV à 205 et 280 nm. La collecte des fractions a été effectuée en fractions de 1,5 ml et de 0,5-1 ml dans la zone d'intérêt. Les fractions ont été congelées après la collecte dans de la carboglace.

Les fractions collectées ont ensuite été séchées en speed vac et reprises dans 100 µl de 0,1% TFA/30% acetonitrile. 20µl des fractions ont été transférés dans des eppendorfs de 500 µl, séchés et lavés à deux reprises avec 100 µl d'eau MilliQ, puis séchés de nouveau.

5 L'activité toxique des protéines contenues dans chaque fraction recueillie après élution a été déterminée à l'aide du test MTT. Seule la fraction 21 présentant une activité toxique significative a été retenue. Le numéro de cette fraction correspond à l'ordre de l'élution en fonction des conditions d'élution énoncée dans cet exemple.

10 Exemple 4: Analyse des protéines obtenues par séparation sur HPLC sur gel SDS-TRICINE.

Le pool de collecte de la fraction 21 obtenue par HPLC, comme décrit dans l'exemple 3, et provenant de 20 injections du pool SEP positif, a été déposé sur un gel SDS-TRICINE 16% précoulé de 10 puits et de 1 mm d'épaisseur (commercialisé 15 par la société Novex). Les conditions d'utilisation du gel correspondent à celles préconisées par le fournisseur. L'échantillon est repris dans 75 µl du tampon d'échantillon 1 fois concentré (SDS-TRICINE N° LC 1676, 1 ml deux fois concentré + 50µl de β-mercaptopropanoïde (Pierce) dilué au 1/2 dans de l'eau) et 25µl de l'échantillon sont déposés sur le gel en trois fois. Le pool de collecte de la fraction 21 provenant de 6 20 injections du pool SEP négatif a été déposé sur le gel dans les mêmes conditions que celles décrites pour le pool SEP positif. La migration sur les deux gels a été effectuée en parallèle dans la même cuve de migration (XCELL II NOVEX (nom commercial)) à 25 un voltage constant de 125 mV pendant 2 heures. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace. Les gels ont été colorés directement après la migration par coloration au zinc/imidazole (kit de coloration 161-0440 commercialisé par la société BIORAD) pour obtenir une coloration négative réversible. Les bandes de protéines sont translucides sur fond opaque.

Exemple 5 : Digestion à la trypsine des bandes de gel.

30 Toutes les bandes de protéines visualisées dans les dépôts de la fraction 21 ont été découpées et soumises à une protéolyse par la trypsine.

Les bandes de gels sont découpées au scalpel en tranches de 1 mm et transférées dans des tubes eppendorfs. Les eppendorfs sont soumis à un pic de centrifugation pour faire tomber les morceaux de gel et après centrifugation 100 µl de tampon de lavage (100 Mm NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>/50% CH<sub>3</sub>CN) sont ajoutés aux morceaux de gel.

5 Après 30 min. d'agitation à température ambiante, le surnageant est enlevé par fractions de 20 µl et l'étape de lavage est renouvelée deux fois. Les eppendorfs sont séchés pendant 5 min. en speed vac. 20 µg de trypsine (Modified sequenal grade PROMEGA V5111) sont repris dans 200 µl de tampon de digestion (5 mM TRIS, pH 8) et sont dissous pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation intermittente

10 et 20 à 30 µl de trypsine resuspendue sont ajoutés aux morceaux de gel. Les eppendorfs sont centrifugés et conservés en chambre chaude à 28°C pendant une nuit. Après digestion les bandes de gel peuvent être utilisées immédiatement pour les mesures de masse ou congelées pour usage ultérieur.

15 Exemple 6 : Digestion chimique au CNBR des bandes de gel.

Dans l'éventualité d'une protéine résistante aux clivages enzymatiques, en particulier à l'action de la trypsine comme décrit dans l'exemple 5, les bandes entre 16kD et 20kD ont été traitées avec du CNBR. Les bandes de gel, déjà utilisées pour les digestions avec la trypsine, sont séchées 5 à 10 min. en speed vac.

20 Une solution de CNBR (FLUKA) à 200 mg/ml a été préparée dans 70 % acide formique (BAKER). 20 µl de cette solution ont été utilisées pour réhydrater les morceaux de gel. La réaction s'est faite pendant 20 h à température ambiante et à l'obscurité. Les peptides sont extraits 3 fois 30 min. avec 100 µl de 0.1 % TFA / 60% Acetonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et concentrées à 20 µl. Ces échantillons sont dilués 5 fois dans 0,1 % TFA/eau. Les conditions de séparation sont celles décrites pour les peptides de la digestion avec la trypsine.

Exemple 7 : Analyse par spectrométrie MALDI-TOF.

30 30 µl de tampon d'extraction (2 % TFA/50 % acétonitrile) sont ajoutés aux échantillons. Les eppendorfs à analyser sont soumis à une centrifugation de 5 min., puis à une sonication de 5 min. et finalement à une centrifugation de 1 min.

Sur un disque en acier inoxydable, 14 dépôts de 0,5 µl de matrice (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique à saturation dans de l'acétone) sont réalisés. Une fine couche microcristalline uniforme est obtenue. 0,5 µl d'une solution de 2 % TFA/eau sont déposés sur cette sous-couche sur les 14 dépôts, puis 0,5 µl d'échantillon à analyser sont ajoutés. Dans cette goutte ainsi formée, 0,5 µl d'une solution à saturation d'acide d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique dans 50 % acétonitrile/eau sont ajoutés. Après un séchage à température ambiante pendant 30 min., les dépôts cristallins sont lavés avec 2 µl d'eau qui sont immédiatement évacués par un souffle d'air. Tous les spectres sont obtenus sur un spectromètre de masse BRUKER BIFLEX (marque de commerce) équipé d'un réflectron. Les mesures (90 à 120 tirs laser sur l'ensemble du dépôt) sont accumulées pour obtenir un spectre de masse qui soit le plus représentatif de l'ensemble des peptides présents dans le sandwich matrice-échantillon. Pour chaque dépôt, une calibration avec les peptides de l'autolyse de la trypsine a été faite afin de pouvoir utiliser une précision de mesure inférieure à 100 ppm.

Les recherches dans les banques de données ont été exécutées dans MS-FIT PROTEINPROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu>). Les paramètres communs, utilisés dans ces recherches, sont (1) base de données : NCBInr, (2) une tolérance de 100-50 ppm, (3) les cystéines ne sont pas modifiées, (4) les méthionines peuvent être oxydées, (5) gamme de poids moléculaire : 1000-100000 Da, (6) jusqu'à 3 sites de coupure peuvent être ignorés.

**Exemple 8 : Séquençage N-terminal des peptides de digestion.**

**(i) Extraction et séparation par HPLC des peptides de digestion.**

Après les mesures de masse sur la totalité de la digestion, le reste des peptides est extrait en 3 fois 30 min. dans un bain de sonication avec 0,1 % TFA/60 % acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et séchées jusqu'à 20 µl en speed vac. Après dilution dans 80 µl de tampon A (0,1 % TFA/eau), les extractions des bandes de gel, digérées avec de la trypsine, sont injectées sur une colonne C18/MZ-Vydac/(125x1.6)mm/5 µm. L'élution des peptides se fait à un débit de 150 µl/min. et dans un gradient allant de 5 % de tampon B (0,09 % TFA/80 % acétonitrile) à 40 % de tampon B en 40 min., puis de 40 % de tampon B à 100 % de tampon B en 10 min. La

détection est faite par mesure de l'absorbance UV à 205 nm. La collecte des pics est effectuée dans des tubes eppendorf de 500 µl. Les fractions sont conservées sur la glace et pour la bande de 18-20 kD du pool 21 SEP positif analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5 (ii) Séquençage N-terminal.

Les fractions ne correspondant qu'à un seul pic de masse ont été analysées par dégradation d'Edman sur un séquenceur (Modèle 477A PERKIN ELMER/Applied Biosystems). Les conditions de séquençage sont celles décrites par le constructeur. Une micro cartouche a été utilisée pour le dépôt des échantillons et les PTH-AminoAcid 10 sont identifiés avec un système HPLC online (Modèle 120A PERKIN ELMER/Applied Biosystems).

Le dépôt de la fraction à séquencer s'est fait en plusieurs dépôts de 15 µl 15 avec des séchages intermédiaires. Le tube ayant contenu le peptide est lavé avec 15 µl d'acide formique 85 % (BAKER). Les séquences d'acides aminés correspondent toujours aux masses mesurées. Les peptides, dont les masses ne correspondent pas à la protéine principale identifiée, ont été séquencés en priorité. De cette manière, il a été possible d'identifier jusqu'à trois protéines dans une bande de gel.

Exemple 9 : Résultats et discussion.

Après HPLC inverse du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif, 20 l'activité toxique de chaque fraction d'élution a été déterminée en utilisant le test MTT. Seule la fraction 21 du pool SEP positif présente une activité toxique *in vitro*. La fraction 21 du pool témoin SEP négatif ne présente aucune activité toxique. L'activité 25 toxique de la fraction 21 du pool SEP positif a été confirmée *in vitro* par FACS, comme décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 sur des cellules astrocytaires murines.

Le contenu protéique de la fraction 21 du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif a été observé après séparation sur gel SDS-TRICINE 16% et coloration du gel au zinc/imidazole. Des protéines de poids moléculaires apparents élevés ont été trouvées dans les deux fractions. Par contre cinq bandes différentes et de 30 poids moléculaires apparents faibles ne sont visibles que dans la fraction 21 du pool SEP positif (bandes 8, 14, 18 et 20 kD). A chaque bande correspond au moins une protéine et des variants desdites protéines qui ont un poids moléculaire apparent proche

de celui de la protéine native. Ces séquences variantes présentent un pourcentage d'homologie ou d'identité avec les séquences natives d'au moins 70%, de préférence d'au moins 80% et avantageusement d'au moins 98 %.

Les protéines d'intérêt de la fraction 21 du pool SEP positif ont ensuite été 5 analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie dans les banques de données. Les résultats montrent la présence de cinq bandes de protéines migrant entre 22 et 5 kD dans la fraction 21 du pool SEP positif et des variants desdites protéines.

Ces protéines sont le fragment C-terminal du Perlecan, qui commence à 10 l'acide aminé 3464 et se termine à l'acide aminé 3707 de la séquence protéique complète, identifiée dans l'identificateur de séquences SEQ ID N° 2, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 identifié en SEQ ID N° 8, la calgranuline B identifiée en SEQ ID N° 17 et la saposine B représentée en SEQ ID N° 15 24. Comme décrit ci dessus des homologues ou variants desdites protéines ont également été identifiés par séquençage. Ces séquences protéiques homologues ou variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines. A titre d'exemple, la SEQ ID N° 9 présente 99 % d'homologie ou d'identité 20 avec la SEQ ID N° 8 du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et le fragment de SEQ ID N° 9 qui commence à l'acide aminé 34 et se termine à l'acide aminé 202 présente 98,88 % d'homologie ou d'identité avec le fragment correspondant de la protéine native identifiée en SEQ ID N° 8.

#### Exemple 10 : Mise en évidence des protéines dans un échantillon urinaire.

Des échantillons d'urine provenant d'un individu SEP négatif et d'un patient SEP positif ont été prélevés. Ces échantillons d'urine ont été purifiés selon le protocole décrit précédemment. Les fractions d'élution finales 21 ont été analysées séparément par spectrométrie de masse. Le profil de masse de chaque fraction correspondant à chaque échantillon d'urine a été comparé au profil de masse obtenu 30 pour les protéines identifiées dans les exemples précédents. Les résultats montrent que pour l'échantillon d'urine provenant du patient SEP positif les masses correspondent aux molécules (i) fragment C-terminal du Perlecan, (ii) précurseur de la protéine

activatrice du ganglioside GM2, (iii) calgranuline B et (iv) saposine B identifiées précédemment. Par contre aucune de ces masses n'a été identifiée dans le profil de masse obtenu après analyse de l'échantillon d'urine provenant de l'individu SEP négatif. Le procédé décrit est utilisable comme essai de diagnostic.

5

Exemple 11 : Essai en Western Blot.

Des Western Blot ont été réalisés sur différentes fractions d'urine brute ou purifiée comme décrit dans l'exemple 2. Des échantillons d'urine provenant d'individus sains et de patients atteints de sclérose en plaques sont testés en parallèle.

10 Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse permettant de séparer les différentes protéines en fonction de leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique. Les Western Blot sont réalisés après transfert des protéines du gel sur une membrane. Pour révéler les protéines transférées, la membrane est saturée en tampon de saturation, puis incubée avec un anticorps directement marqué à la phosphatase

15 alcaline. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-calgranuline (anticorps monoclonal de souris, clone CF 145 sous-type IgG 2b commercialisé par la société Valbiotech : référence MAS 696p lot PC96G696). Le substrat de l'enzyme est le dichlorure de 3,3'-  
(1,1'-biphényl)4,4'diazonium et 2-naphtalenyl phosphate de sodium (commercialisé sous la dénomination  $\beta$  Naphtyl acid phosphate Sigma réf. N7375 et  $\alpha$  dianisine Tetrazotized D3502) est ajouté pour la révélation des bandes et la visualisation des protéines liées à l'anticorps. Une molécule de masse moléculaire apparente d'environ

20 14 000 est révélée dans les urines purifiées de patients atteints de SEP, avec un signal relativement intense. Cette protéine correspond à la calgranuline B (masse moléculaire apparente : 14 kD). Par contre, aucun signal n'est observé à partir d'urine d'individus

25 sains. Cette observation confirme la présence de cette protéine spécifiquement dans les urines de patients atteints de SEP et la mise en œuvre d'un procédé de détection utilisant un anticorps reconnaissant la protéine.

Exemple 12 : Production d'anticorps monoclonaux.

30 La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice. 20 souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-

10-14 acide tétraméthylpentadécane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard,  $5.10^6$  à  $10.10^6$  hybridomes dilués dans 0.5ml de tampon stérile NaCl 0,145M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM à pH 7.4. sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20<sup>ème</sup> de son volume de tris-HCl 1M à pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 20 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,4. Parallèlement une colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposé sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont élues à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions élues sont neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm ( $e 1\%, 1\text{cm} = 14.0$  Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA. Les peptides immunogènes référencés SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 65 ont été utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, selon le protocole décrit ci dessus. Mais, il est à la portée de l'homme du

métier de définir d'autres protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

Production de protéines recombinantes et d'anticorps polyclonaux et  
5 monoclonaux.

Protéines recombinantes :

Les protéines recombinantes GM2AP (SEQ ID NO :73) et Saposine B (SEQ ID NO :74) utilisées pour réaliser la gamme étalon de cette étude ont été produites en système procaryote et purifiées à partir des clones de ces deux protéines 10 obtenus dans notre laboratoire en utilisant les méthodes et protocoles bien connus de l'homme de l'art.

Anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B :

Les anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B utilisés pour réaliser l'étude ont été soit produits dans notre laboratoire ou donnés généreusement.  
15 Des anticorps polyclonaux anti-Saposine B et anti-GM2AP (Li *et al.*, Glycoconjugate, 1984) ont été utilisés pour l'étude (cf les exemples ci-dessous) : ils sont dénommés SAP84 et GM2AP84.

Des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 50 µg de protéine GM2AP ou Saposine B procaryote achetée ont été injectés à des lapins aux jours J0, J28 et J56 ; deux injections de rappel ont été réalisées une fois par mois pendant deux mois consécutifs. Les deux anticorps polyclonaux anti-GM2AP et deux anticorps polyclonaux anti-Saposine B ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par 25 Western blot et par Elisa.

Des anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP ou Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 75 µg de peptides GM2AP ou Saposine B définis, produits et couplés à KLH dans notre laboratoire ont été injectés aux jours J0, J28 et 30 J56 ; plusieurs boosts ont été réalisés une fois par mois pendant 5 mois consécutifs avec injection de 75 µg à chaque fois. Quatre anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP, quatre anticorps polyclonaux anti-peptides Saposine B et quatre anticorps

polyclonaux de lapins anti-peptides MRP14 ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par Western blot et par Elisa. La séquence des peptides GM2AP, Saposine B et MRP14 choisis sont décrites dans les figures de 1 à 3.

5 Il a été obtenu :

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 15 acides aminés de GM2AP : 189-190 ; un anticorps anti-peptide de 18 acides aminés de GM2AP : 191-192 (cf. Figure 1),

10 - un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 19 acides aminés de MRP14 : 193 ; un anticorps anti-peptide de 17 acides aminés de MRP14 : 195-196 (cf. Figure 2),

- un anticorps anti-mélange de trois peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B: 74-75 ; un autre anticorps anti-mélange de 3 peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 72-73 (cf. Figure 3).

15 Des anticorps monoclonaux anti-fraction native ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art. La « fraction native » correspond à la fraction d'élution cytotoxique obtenue à partir du pool des 80 litres d'urine de patients SEP et après purification. C'est la dernière fraction d'élution qui contient les trois protéines GM2AP, Saposine B. 20 MRP14. 30 µg de cette fraction de purification ont été injectés à trois souris aux jours J0, J14, J28 et le prélèvement a été effectué à J38. Après « screening » et fusion cellulaire, protocoles connus de l'homme de l'art pour l'établissement d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux, les hybridomes ont été ré-injectés à la souris et le liquide d'ascite a été récupéré 10 jours après. Les anticorps ont été purifiés sur colonne 25 sépharose-Protéine A et la spécificité vis-à-vis de la fraction utilisée pour l'immunisation a été vérifiée par Western blot et par Elisa. Ainsi quatre anticorps monoclonaux ont été obtenus : 19C1A7, 3D3F9, 18C8C5 et 7D12A8.

Exemple 13 : Dosage des protéines MRP14 dans les urines par technique  
30 ELISA.

Les protéines MRP14, MRP8 et l'hétérocomplex MRP8/14 ont été dosés dans des urines humaines en utilisant (i) soit une technique de dosage Elisa selon le

procédé connu de l'homme de l'art et en utilisant les anticorps anti-MRP décrits dans les exemples précédents ; (ii) soit le kit 'MRP Enzyme Immunoassay' commercialisé par BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland, en utilisant les anticorps du kit, le protocole étant réalisé suivant la notice du kit..

5                   Déttection de MRP14 et MRP8/14 dans des urines.

Les dosages a été réalisés à partir de 17 urines d'individus issus de la population active (TS), de 27 urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP) et de 7 urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN).

10                  - La figure 4 illustre les taux de MRP8 dosés dans ces urines : alors que la concentration en MRP8 est quasiment nulle dans les urines AMN, il n'y a pas vraiment de différence de distribution entre les urines TS et SEP. Notons cependant que les différences observées sont quasiment négligeables car les concentrations dosées sont extrêmement faibles.

15                  - La figure 5 illustre les taux de MRP14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différences de distribution des concentrations entre les urines TS et AMN, les concentrations sont plus élevées dans certaines urines SEP.

20                  - La figure 6 illustre les taux d'hétérodimère MRP8/14 dosés dans les mêmes urines :alors qu'il n'y a pas vraiment de différence entre les concentrations des urines TS et AMN, on observe des plus fortes concentrations dans certaines urines SEP, correspondant peut-être à une sous population de patients SEP caractérisée par une activité de la maladie. MRRP8/14 dosé dans les urines est un marqueur de l'activité de la maladie SEP caractérisée par un pic d'inflammation).

25                  - La figure 7 récapitulative confirme qu'il n'y a pas de différence significative de concentration en MRP8 et en MRP14 entre les urines TS, AMN et SEP, alors qu'une faible différence de concentration en MRP8/14 est observée entre ces urines, cette concentration étant plus élevée en moyenne dans les urines SEP et étant un marqueur de l'activité de la maladie (pic d'inflammation).

Exemple 14 : Protocoles ELISA utilisés pour le dosage des protéines  
30                  GM2AP et Saposine B.

Les protéines GM2AP ou Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ? en

suivant le protocole Elisa décrit par Gardas et al. (Glycoconjugate Journal 1, 37-42, 1984). Les principales étapes sont brièvement décrites ci-dessous :

A chaque étape, les puits d'une microplaqué de 96 puits sont remplis avec 200 µl de la solution désignée. Les puits sont d'abord « coatés » avec une solution de GM2AP (protéine recombinante procaryote) diluée à 50 ng/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6. Après incubation une nuit à 4°C, la solution est éliminée et les puits sont lavés quatre fois avec du tampon PBS pH 7,4 contenant du Tween-20 0,05% (PBS-Tween). Les microplaques ainsi coatées sont stockées à 4°C pendant environ 2 semaines.

Les échantillons d'urine à trois dilutions différentes (20x, 40x et 80x ou d'autres dilutions appropriées) sont incubés avec une dilution appropriée de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GM2AP ou anti-Saposine B pendant une nuit à 4°C. Une série de dilutions standard d'une protéine recombinante allant de 2,0 à 62,5 ng/ml est utilisée pour réaliser la gamme étalon et sont traitée de la même façon. Toutes les dilutions sont faites en tampon PBS-Tween contenant 1 mg/ml d'ovalbumine. Ainsi, 0,2 ml de chaque solution incubée est ajoutée dans des puits « coatés » en duplicité et les plaques sont laissées pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis encore avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxidase et diluée environ 1200 fois. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les puits sont lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis à nouveau avec le réactif de coloration. Le réactif de coloration consiste en 100 µg d'acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline) sulfonique et 10µl de 30% de peroxyde d'hydrogène pendant une heure à température ambiante et le degré de coloration de chaque micropuits est estimé par lecture d'absorbance à 405 nm.

Une courbe standard est construite en mettant en abscisse la concentration de GM2AP de la gamme étalon où de Saposine B avec une échelle logarithmique et en ordonnant le pourcentage d'absorbance avec une échelle linéaire. Le pourcentage d'absorbance de l'échantillon est le rapport d'absorbance entre l'échantillon d'urine et le contrôle qui contient seulement l'antisérum, sans l'antigène soluble.

Une solution de protéine recombinante GM2AP produite en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaqué à 96 puits, soit 50µl par puits

d'une solution à 0,5 µg/ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. L'anticorps polyclonal anti-GM2AP produit dans le laboratoire (lapin 79) a été purifié et dilué en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. Cette solution est diluée au 1/8000<sup>ème</sup>. La solution est utilisée pour réaliser  
5 une gamme étalon avec 8 points de gamme couvrant les concentrations de 0 à 500 ng/ml. Une préincubation est réalisée pendant une nuit à température ambiante entre 100 µl d'anticorps et 100 µl d'échantillon d'urine à doser ou de solution protéine recombinante GM2AP ou Saposine B servant pour la gamme étalon. Après lavage de la microplaqué en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation sont ajoutés par puits, puis  
10 incubés pendant deux heures à température ambiante. La microplaqué est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase et dilués au 1/5000 sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après de nouveaux lavages de la microplaqué,  
15 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou de Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Une solution de protéine recombinante GM2AP ou Saposine B produite  
20 en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaqué à 96 puits, soit 50µl par puits d'une solution à 1,5 µg /ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. Les anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP produits dans le laboratoire (lapin 190 et lapin 191) purifiés sont utilisés seuls ou en  
25 mélange dilués au 1/1000 pour chacun en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. La gamme étalon est réalisée en utilisant de la protéine recombinante procaryote GM2AP ou Saposine B diluée de façon à couvrir la gamme de concentration 0 à 1500 ng/ml avec 8 points. 100 µl d'anticorps (un anticorps ou les deux ensemble) sont pré-incubés en présence de 100µl d'échantillon d'urine à tester ou  
30 de solution GM2AP ou Saposine B recombinante, pendant une nuit à température ambiante. Après lavage de la microplaqué en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation est ajouté par puits puis incubés pendant deux heures à température

ambiante. La microplaqué est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, dilués au 1/5000, sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après lavage de la microplaqué, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés 5 pendant 20 minutes à température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou Saponine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Exemple 15 : Dosage des protéines GM2AP dans les urines.

10 La protéine GM2AP a été dosée dans les urines de 22 patients atteints de sclérose en plaques (SEP), 5 patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et 9 individus choisis parmi la population active et recueillies pendant une visite médicale (Healthy), en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP. Les patients SEP sélectionnés pour cette étude sont des 15 patients tout azimut, c'est-à-dire avec différents stades et profils de la maladie, et différents traitements, etc...

Les résultats du dosage sont rapportés dans la figure 8. Alors que seulement 0/5 urines OND et 2/9 urines dites 'Healthy' présentent une concentration en 20 GM2AP supérieure à 200 ng/ml, 10/22 (soit 45%) présentent une concentration supérieure à 200 ng/ml.

Ces résultats indiquent que si la protéine GM2AP est présente en très faible concentration (<400 ng/ml) dans les urines d'individus de la population active, elle est présente en plus forte concentration dans les urines de patients SEP. Cependant 25 12 urines SEP présentent également des taux faibles de GM2AP. Parmi ces 12 patients, 10 sont en traitement. Les fortes concentrations urinaires de GM2AP semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencé par tout traitement en cours. Notons que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de GM2AP (ces deux cas ont été inclus volontairement dans 30 l'étude, car ils présentaient tous deux une activité gliotoxique dans leur urines contrairement aux autres individus de cette même catégories). Il est impossible de savoir s'il s'agit d'individus sains, ou atteints d'une pathologie, ou des individus

atteints d'une sclérose en plaques car les échantillons des individus dits « Healthy » ont été prélevés de manière anonyme, sans connaissance du dossier clinique.

Des concentrations urinaires plus élevées de GM2AP sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de GM2AP peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peuvent également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP benigne en début d'évolution, etc ....

10 Les valeurs absolues des concentrations GM2AP détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

15 Exemple 16 : Dosage des protéines Saposine B dans les urines.

La protéine Saposine B a été détectée dans les mêmes échantillons d'urines que ceux utilisés pour l'étude de la détection de GM2AP. Les dosages ont été réalisés en parallèle avec ceux du GM2AP, dans une même étude, en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-Saposine B.

20 Les résultats du dosage Saposine B sont reportés dans la Figure 9. 0/5 urines OND et 2/9 urines Healthy présentent une concentration en Saposine B supérieure à 2 µg/ml, alors que 6/22 (soit 27%) présentent une concentration supérieure à 2 µg /ml.

Ces résultats indiquent que la protéine Saposine B est présente dans 25 chaque urine (population dite saine ou population dite malade) à des concentrations non négligeables, c'est-à-dire < 2µg /ml. Ces résultats de dosage sont compatibles avec ceux décrits dans la bibliographie. Cependant même si la Saposine B est présente dans chaque urine, elle semble être présente en plus forte concentration dans certaines urines SEP. Cette augmentation de concentration de saposine B dans les urines Sep est peut-être masquée par la concentration basale de cette protéine à l'état ordinaire. Ainsi les 30 fortes concentrations urinaires de Saposine B semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la

maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencée par tout traitement en cours. La Saposine B dosée seule semble être cependant un marqueur un peu moins discriminant d'une forme ou d'une activité de la maladie que le GM2AP. Notons encore une fois que deux individus de la population active ont des concentrations 5 élevées de Saposine B et que ce sont les deux même individus qui présentaient aussi une forte concentration en GM2AP dans leurs urines.

En conclusion, des concentrations urinaires plus élevées de Saposine B sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de Saposine B peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de 10 la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peuvent également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP benigne en début d'évolution, etc .... Mais d'une façon générale, les sortes 15 de concentrations de Saposine B seules semblent être des marqueurs moins discriminants que les fortes concentrations de GM2AP seules.

Les valeurs absolues des concentrations Saposine B détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

20

Exemple 17 : Co-dosage des protéines GM2AP et Saposine B dans les urines.

La Figure 10 reporte les concentrations de GM2AP dosée dans les échantillons d'urine décrites dans la Figure 5 par rapport à la concentration de Saposine 25 B dosée dans ces mêmes échantillons et décrite dans la Figure 6. Dans ce graphe sont reportés les échantillons SEP (losanges foncés) et les échantillons OND et 'Healthy' (losanges blancs).

Sur ce graphe, il apparaît clairement que :

- plus la concentration en GM2AP est élevée dans les urines, plus la 30 concentration en Saposine B est élevée. (Nous avons montré que ce n'est pas un cas général avec d'autres protéines et que cela ne traduit pas une perturbation rénale, avec le dosage de la créatinine en parallèle pour chacun des échantillons testés.) ;

- les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B sont caractéristiques des échantillons SEP (à l'exception des deux urines de la population active, mentionnées ci-dessus). Ces concentrations élevées conjointes de GM2AP et Saposine B sont des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une fenêtre de la maladie (quadran à droite et en haut du graphe).

En conclusion, cette analyse confirme que des concentrations urinaires élevées de GM2AP ( $>400 \text{ ng /ml}$ ) et de Saposine B ( $>2 \mu\text{g /ml}$ ) sont co-détectées dans les urines de patients SEP et peuvent représenter des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peuvent être influencée par tout traitement en cours. Il est avantageux de doser les deux protéines en parallèle dans chaque échantillon, et de considérer les deux concentrations.

Dosage de GM2AP et Saposine B dans l'urine de deux patients en cinétique.

15 Patient SEP n°1 - Forme Rémittente Progressive.

Des urines de ce patient ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subit à J1 un flash de corticoïdes puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique). La figure 11 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 12 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash de corticoïdes jusqu'à 90 jours.

25 Patient SEP n°2 - Forme Progressive.

Des urines de ce patient ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subit à J1 un flash d'Endoxan puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique et à J60, des signes d'aggravation de la maladie ont été observés). La figure 13 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 14 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations

élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash d'Endoxan (ou encore appelé cyclophosphamide) jusqu'à 23 jours et semblent augmenter pour devenir élevées à J60, montrant ainsi une parfaite corrélation avec l'évolution des signes cliniques.

5 Ces résultats confirment que :

- des concentrations fortes de GM2AP et Sapsoine B dans les urines sont des marqueurs de la pathologies SEP, et en particulier la co-détection des fortes concentrations des deux protéines conjointement (traduit par le produit des deux 10 concentrations) ;

- les fortes concentrations de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de l'activité de la maladie (ici pendant la poussée) ou sont des marqueurs influencés par les traitements immuno-supresseurs comme les corticoïdes ou l'Endoxan qui abaissent les concentrations.

15 Cet exemple illustre le fait que ces marqueurs peuvent être utilisés entre autres :

- pour réaliser un suivi thérapeutique d'un patient et évaluer le bénéfice thérapeutique d'un traitement pour un patient donné ; ou

- de prédire une aggravation de la maladie, prédire un pic d'activité, etc...

20 - de décider une (re)prise thérapeutique anticipée sur les signes cliniques

Exemple 18 : Corrélation entre la détection des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans les urines et la gliotoxicité mesurée dans ces urines.

Afin de vérifier une corrélation entre la présence de ces protéines seules 25 ou en combinaison dans les urines et la gliotoxicité des urines, ont été dosées en parallèle les concentrations en protéine d'intérêt et la gliotoxicité d'un échantillonage d'urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), de patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et d'individus issus de la population active dit « Healthy ». Parmi les patients SEP, on note des patients avec différentes formes et 30 stades de la maladie, sous traitement ou non, à différentes activités de la maladie.

Les protéines MRP, GM2AP et Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en suivant les protocoles Elisa décrits ci-dessus. Les dosages analysés dans

cet exemples sont ceux décrits dans les exemples précédents. Chaque échantillon d'urine analysé en Elisa a été analysé par le test MTT pour mesurer la gliotoxicité de chaque échantillon. La gliotoxicité est exprimée en pourcentage de cellules mortes (estimé par colorimétrie en utilisant les sels de tetrazolium) d'une lignée cellulaire astrocytaire murine (CLTT1.1) après 48 heures d'incubation en présence d'urine centrifugée.

La figure 15 représente la concentration en GM2AP en fonction de la gliotoxicité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites « Healthy » (losanges noirs) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que toutes les urines témoins (OND et Healthy) ont des taux en GM2AP faibles (<400 ng/ml) et une gliotoxicité faible (<15%), à l'exception d'une urine témoin Healthy (déjà commentée dans l'exemple 15) pour laquelle on observe une forte concentration en GM2AP et une gliotoxicité.

15 Les urines SEP sont réparties en trois sous-populations :

- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et faible gliotoxicité (<15%),
- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et gliotoxicité (>15%), soit essentiellement 3 urines,
- urines à forte concentration en GM2AP (>400 ng /ml) et forte gliotoxicité (>15%).

Ces trois sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, ....

25 Cependant on peut noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP présentent également une forte gliotoxicité.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en GM2AP et gliotoxicité (toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP sont gliotoxiques (10/10), et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 3 urines/12 SEP). Ceci traduit l'implication de la protéine GM2AP dans le mécanisme de gliotoxicité, seule ou

en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée, mais reconnaissable par un anticorps anti-GM2AP. De plus la co-détection d'une forte concentration en GM2AP dans les urines et d'une forte gliotoxicité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP.

5 La figure 16 représente la concentration en Saposine B en fonction de la gliotoxicité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples .15 et 16. On observe que plus les urines 10 sont riches en Saposine B, plus elles sont gliotoxiques. Il y a une corrélation assez nette entre concentration de Saposine B et gliotoxicité des urines.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en Saposine B et gliotoxicité. Ceci traduit l'implication de la protéine Saposine 15 B dans le mécanisme de gliotoxicité, seule ou en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par l'anticorps anti-saposine B utilisé pour le dosage.

La figure 17 représente le produit des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de la gliotoxicité des urines déterminée par test MTT.

20 Les 22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) des exemples 15 et 16 ont été reportés dans la figure 17. La gliotoxicité de ces urines est analysée en fonction du produit des concentrations en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire en fonction de la co-détection des deux protéines dans les urines. On observe très nettement une corrélation entre le 25 produit des deux concentrations GM2AP et Saposine B et la gliotoxicité, bien plus importante qu'en ne considérant qu'une seule protéine. On observe que 5/5 des urines OND ont un produit de concentration GM2AP et Saposine B faible et une gliotoxicité faible ; 8/9 urines « Healthy » ont un produit de concentration GM2AP et SaposineB faible et/ou une gliotoxicité faible. Par contre, on distingue essentiellement trois sous- 30 populations d'urines SEP :

- urines à faible concentration en GM2AP.Saposine B et faible gliotoxicité (<15%).

- urines à forte concentration en GM2AP. Saposine B et forte gliotoxicité (>15%).

Ces deux sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, .... Cependant il est très important de noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire ayant conjointement une forte concentration en GM2AP et Saposine B, présentent également une forte gliotoxicité. Les deux sous populations de patients SEP sont d'autant plus marquées et nettes que l'on considère conjointement les trois marqueurs : gliotoxicité, concentration élevée en GM2AP et concentration élevée en Saposine B. Ceci est confirmé à la figure 18.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée de GM2AP et Saposine B et Gliotoxicité. Toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP et Saposine B sont gliotoxiques, et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP et Saposine B ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 2 urines/22 SEP. Ceci traduit l'implication des deux protéines GM2AP et Saposine conjointement ou en combinaison dans le mécanisme de gliotoxicité, sous leur forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par les anticorps anti-GM2AP et anti-saposine B utilisés pour le dosage. De plus la co-détection d'une forte concentration urinaire en GM2AP et Saposine B et d'une forte gliotoxicité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie ?), par rapport à une autre sous population. Ces trois marqueurs considérés conjointement permettent de discriminer entre deux sous populations de patients SEP.

Evolution de la gliotoxicité et des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de l'évolution de la maladie de deux patients après et pendant traitement.

La corrélation entre gliotoxicité, forte concentration en GM2AP ET Saposine dans les urines et pathologie SEP a également été confirmée en mesurant ces trois paramètres dans l'urine de deux patients au cours de l'évolution de leur maladie.

Patient n°1 : SEP forme rémittente-progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash de corticoïde à J1. Après le flash, il a montré une amélioration clinique jusqu'à J90 - (cf. figures 11,12).

Patient n°2 : SEP forme progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash d'Endoxan (encore appelé cyclophosphamide) à J1. A J60, il présente de nouveaux des signes cliniques d'aggravation de sa maladie - (cf. figures 13,14).

5

Pour les deux patients, il a été montré :

10

- une corrélation entre la gliotoxicité urinaire et l'évolution clinique de la maladie (lorsque les signes cliniques sont sévères, la gliotoxicité est élevée ; lorsque les signes cliniques diminuent suite au traitement, la gliotoxicité diminue et devient stationnaire ; lorsque les signes d'aggravation apparaissent après le traitement, la gliotoxicité semble augmenter de nouveau),
- une corrélation entre le taux de gliotoxicité dans les urines de patients et les concentrations de GM2AP et Saposine B, et
- une corrélation entre les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B et l'évolution clinique de la maladie.

15

En conclusion : le dosage des protéines GM2AP ET Saposine B dans les urines est un bon marqueur discriminatif d'une sous population de la SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie). Les protéines GM2AP et/ou Saposine B sont impliquées dans le mécanisme de gliotoxicité, seules ou en combinaison, sous leur forme naturelle ou sous une forme reconnaissable par les anticorps polyclonaux utilisés pour leur dosage. Comme les protéines GM2AP et Saposine sont co-détectées en forte concentration dans les urines gliotoxiques, il est possible que ces deux protéines agissent en combinaison pour induire la gliotoxicité.

20

Exemple 19 : Analyse immunohistochimique de l'expression des protéines GM2A, SAPB, MRP14 et MRP8 dans un système de culture producteur de gliotoxine in vitro (cultures de monocytes), ainsi que dans le tissu cérébral normal et pathologique de SEP et de témoins.

25

Protocole : Des cultures de monocytes d'un patient atteint de SEP et d'un témoin sain ont été réalisées en parallèle, selon le protocole présent décrit brièvement.

30 A partir de sang périphérique de ces deux volontaires prélevé sur ACD, les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolés sur Ficoll en utilisant la technique connue de l'homme de l'art. Les cellules récupérées (au niveau de l'anneau) sont lavées

deux fois en milieu RPMI. Les cellules sont alors énumérées sur Kovas-slide et sont ensemencées en flacon primaire de 25 cm<sup>2</sup> ou sur lame Labtek (8 cupules) (en permanox) en milieu RPMI supplémenté avec 15% de sérum AB humain à J0. Les cellules sont cultivées sur des lames alvéolées de type « Labtek » afin de disposer d'un support direct pour l'analyse des monocytes qui adhèrent au support et se différencient ultérieurement en macrophages. Pour les lames, 2.10<sup>6</sup> cellules sont ainsi ensemencées à raison de 0,25 10<sup>6</sup> cellules/puits. Pour les flacons, 4.10<sup>6</sup> cellules sont ensemencées à raison de 0,25 10<sup>6</sup> cellules/puits. A J1, les cellules en suspension sont récupérées et les puits des Labtek ou les flacons sont lavés deux fois en RPMI (au préalable chauffé à 10 37°C) avant de rajouter du milieu RPMI supplémenté avec 5% de sérum AB humain. A J1, J3, J6, J9, J12 ou 14, J15 le milieu de culture est changé ; les surnageants sont prélevés et les cellules fixées sur lames en utilisant les techniques connues de l'homme de l'art. A chaque changement de milieu, au moins deux lames ont été fixées en paraformaldéhyde et conservées pour l'analyse immunohistochimique.

15 Composition du milieu : RPMI (500 ml) avec 15ml de glutamate 200 mM, 5 ml de pyruvate de sodium 100 µM, 5 ml d'acides aminés non essentiels (100x), des antibiotiques penicilline et streptomycine 100 000 U /µl et des anticorps anti-interferon humains à 100 U/µl.

Résultats : Quatre cultures de monocytes *in vitro* ont été ainsi étudiées en 20 cinétique : deux cultures de monocytes issus de sang d'individus contrôles et deux cultures de monocytes issus de patients SEP. A différents temps de la culture (J0, J1, J3, J6, J9, J12, ....), les surnageants correspondants ont été également récupérés. Une fois la cinétique complétée, les lames correspondant aux différents jours de cultures ont été incubées en présence d'anticorps polyclonaux anti-GM2A, SAP-B, MRP-8 et 25 MRP14. La gliotoxicité de chaque surnageant ainsi récupéré a été estimé par test MTT. La concentration en protéine GM2AP, MRP14 et Saposine B a également été déterminée dans chaque surnageant par protocole Elisa comme décrit dans les exemples 13 et 14.

Les résultats d'immunofluorescence sur cellules fixées sont résumés ci-dessous ; on peut noter :

- une absence d'expression de MRP8 à tous les stades des 2 cultures

- une expression nette de MRP-14 dans la période entre J9 et J15, retrouvée dans les deux cultures, quoique plus forte dans la culture SEP. Cette expression semble corréler une étape de différenciation macrophagique.

5 - une très faible expression (faible intensité et faible nombre de cellules) est observée en début de culture dans la culture témoin et correspond vraisemblablement à la présence physiologique de GM2A dans les lysosomes macrophagiques.

10 - Dans la culture SEP, une expression beaucoup plus nette de GM2A (plus forte intensité et nombre de cellules plus important) est observée, avec un marquage cytoplasmique relativement homogène entre J3 et J6, disparaît à J9 et est à nouveau notée à J14-J15 avec un marquage intense et localisé à la périphérie cytoplasmique, dessinant le contour interne de la membrane plasmique. Ces observations ne sont pas retrouvées dans l'ensemble des lames témoins.

15 L'analyse avec le anticorps anti-SAP-B n'a pas permis d'obtenir un marquage immuno-histochimique interprétable.

20 Dans les cultures de monocytes SEP déjà effectuées, 3/3 ont présenté un pic de gliotoxicité à J9 et 2/3 un pic plus faible à J6. Aucun pic n'étant détecté dans les cultures de monocytes de 2/2 témoins non-SEP analysés en parallèle. De même, le dosage des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans le surnageant des cultures cellulaires au cours de la cinétique a montré que les protéines SapB et GM2AP sont détectées par Elisa dans les surnageants des monocytes SEP et non dans ceux des monocytes témoins, aux jours J6 et surtout J9 de la culture ; les protéines ne sont pas détectées au-delà de cette cinétique. Notons que les anticorps utilisés pour le dosage peuvent reconnaître les formes physiologiques des protéines, mais également des formes complexées et/ou modifiées.

25 On constate donc que la période J6-J9 pendant laquelle on observe une gliotoxicité la plus importante dans le surnageant, est couverte par la période J3-J15 pendant laquelle on observe une production moins différenciée du témoin négatif de GM2A dans les cellules avec des fluctuations quantitatives et qualitatives de son expression cellulaire (quantité d'expression et localisation cellulaire).

Exemple 20: Technique d'immunohistologie sur coupes de cerveaux en paraffine.

Les coupes histologique préparées en paraffine sont déparaffinées en xylène et alcool avant de subir un prétraitement qui a pour but de démasquer les antigènes ; ce prétraitement peut correspondre à (i) deux fois 5 minutes sous micro-onde (750W) en présence d'un tampon citrate de sodium, acide citrique, (ii) un traitement à l'acide par incubation 15 minutes dans une solution d'acide périodique 1% ou par incubation 5 minutes dans une solution d'acide formique 99%. Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées par incubation des lames 30 minutes en eau oxygénée 1% puis lavage extensif en eau pendant 15 minutes. Le bruit de fond est bloqué en incubant les lames 30 minutes en présence de PBS Triton 0.03%, 10% sérum Donkey (pour les anticorps polyclonaux) ou 10% sérum Goat (pour les anticorps monoclonaux). Un marquage avec l'anticorps primaire est réalisé en appliquant 100 à 200 µl de solution d'anticorps primaire par lame (0.5 à 5 µg /ml selon le titre) dans du PBS Triton 0.03% puis en incubant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 3 fois en PBS-Triton pendant 10 minutes. Un marquage anticorps secondaire est réalisé en utilisant des anticorps biotinylés capables de se fixer spécifiquement aux anticorps primaires, par exemple des anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris dilués dans du PBS-Triton 0.03%. Les lames sont lavées et incubées dans une solution pendant 2 heures (2 µl complexe streptavidine-biotine-peroxydes, 1600 µl PBS-Triton 0.03%). Les lames sont de nouveau lavées avant d'être révélées à l'abri de la lumière dans le tampon A puis rincées à l'eau avant observation microscopique. Tampon A pour 5 lames : 25 ml Tris0.05M pH 7.6, 2.5 ml Imidazole 1M, 15 ml eau stérile, 2 ml DAB 5 mg/ml, 5 ml Nickel d'ammonium 10%, 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%.

Les mêmes anticorps ont été utilisés pour une étude immunohistochimique, selon la technique décrite brièvement ci-dessous, sur lames paraffinées obtenues par coupe au microtome de cerveaux prélevés post-mortem de SEP et de témoins décédés de pathologies non-neurologiques.

Les résultats de l'analyse sont résumés ci-dessous :

Il n'y a pas de marquage des cerveaux « non-SEP » et SEP dans la substance grise et la substance blanche « normale (non lésée) avec les différents anticorps anti- MRP8, MRP14, GM2A. Une réactivité non spécifique n'a pas permis

d'interpréter les résultats avec l'anticorps anti-saposine B dans cette application immunohistochimique.

Par contre on note, dans les zones de plaques des cerveaux SEP :

- une réactivité anti-MRP14 dans les cellules macrophagiques et microgliales, ayant une distribution relativement homogène sur toute l'étendue des zones de démyélinisation (plaques),
- une plus faible (moins fréquente) réactivité anti-MRP8 liée essentiellement aux infiltrats lymphoïdes périvasculaires
- une nette réactivité anti-GM2A dans les macrophages et microgliocytes des zones de plaques, avec une densité particulière dans les zones constituant le « mur glial » en limite périphérique de plaque. Un marquage de quelques astrocytes a aussi été retrouvé dans les zones de démyélinisation.

Ces différentes observations montrent qu'il existe une hyperexpression particulière des protéines MRP-14 et GM2A dans les cultures de monocytes de SEP produisant une activité gliotoxique dans leur surnageant, ainsi que dans les zones définissant des plaques de démyélinisation dans les cerveaux de SEP. Elles témoignent donc de la réalité de la coïncidence entre leur co-expression anormale, la production d'activité gliotoxique et les lésions de démyélinisation.

De plus, leur production anormale dans le contexte de la SEP, dans les cellules macrophagiques sanguines ainsi que dans celles du cerveau, indique qu'il est fondé de réaliser leur dosage dans les fluides biologiques pour corrélérer leur quantité avec l'activité lésionnelle et inflammatoire de la SEP.

Exemple 21 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération des cellules T (Sredni et al., 1981).

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes/macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI).  $2.10^4$  cellules T ( $2.10^5$  cellules /ml) et  $2.10^4$  cellules B autologues irradiées ( $2.10^5$  cellules /ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de

l'antigène sous un volume final de 200 µl dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 µCi de 3H-thymidine dans 50 µl de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuits sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant ; la radioactivité b adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur bêta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés comme moyenne arithmétique de cpm/culture ('coups par minute').

Exemple 22 : Protocole de détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées avec un peptide se fixant au CMH I).

1) Matériel :

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell Embo J 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent également être utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0.1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995 25 : 1638-1642).

Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100 µM à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24 : 5 777 ; Couillin et al. Eur J Immunol 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de 8.105 cellules dans un volume de 64 µl, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 µM iodoacétamide, 2 µg /ml aprotinine, 10 µM leupeptine, 10 µM pepstatine et 10 µg/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140 µl de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc, Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10 µg /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la B2m. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé à 2 µg /ml pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100 µM dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

3) Stabilité des complexes HLA/peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet, on a utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié, on a éliminé les

peptides endogènes (comme décrit en 2)) puis on l'a mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2) avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de manière classique. Avec le lysat de la cellule T2, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.
2. Utilisation d'au moins deux polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à une séquence peptidique choisie parmi SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine

plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

3. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

4. Utilisation selon la revendication 3, de cinq polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide comprend une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

7. Utilisation d'un fragment polypeptidique défini dans la revendication 1 ou dans la revendication 3 pour la préparation d'un peptide immunogène, caractérisé en ce que ledit peptide comprend tout ou partie d'au moins une des séquences référencée SEQ ID N° 58 à 65.

8. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatische de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatische de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

11. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à déetecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléotique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

12. Utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à déetecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

14. Procédé pour déetecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit ligand est un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

16. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide comprend une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

22. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment comprenant au moins une mutation par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

23. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

24. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPAVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

25. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

26. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il consiste en une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

27. Utilisation d'au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 22 à 26 pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou autoimmune.

28. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que le polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 est utilisé

en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

29. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que  
5 l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et le ligand.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'on met en  
10 contact l'échantillon biologique avec un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 et avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

31. Procédé selon la revendication 29 ou 30, caractérisé en ce que ledit  
15 ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

32. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 dans un échantillon biologique caractérisé  
20 en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que ledit ligand est  
25 anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

34. Procédé selon la revendication 30 ou 31, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec un ligand tel que défini dans l'une quelconque  
30 des revendications 31 et 33 et au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, puis on détecte la

formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que le ligand est  
5 un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

36. Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26.

10 37. Utilisation d'un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est le fragment nucléotidique défini dans la revendication 35, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, et les fragments complémentaires desdits fragments.

20 38. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 35, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 36 caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

25 40. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide biologique, on analyse par spectrométrie de masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

41. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 8 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, et de préférence SEQ ID Nos :8, 9, 17 et 24.

42. Utilisation, selon la revendication 41, dans laquelle les séquences peptidiques sont comprennent les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et de la saposine B.

43. Utilisation, selon l'une quelconque des revendications 41 ou 42, qui est associée à l'utilisation d'une détection d'une activité gliotoxique.

44. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on dose au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour détecter ou prévenir un état pathologique, le dosage permettant d'obtenir une valeur de concentration qui est comparer à une valeur seuil représentative d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

30

45. Procédé, selon la revendication 44, dans lequel la valeur seuil est obtenu par un test ELISA pour un échantillon d'urine, cette valeur étant de :

- 400 ng/ml pour le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, pour l'anticorps GM2AP84, et
- 2 µg/ml pour la saposine B, pour l'anticorps SAPB84.

5                  46. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on détecte au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour prévenir un état pathologique, la détection s'effectuant dans des cellules ou dans les surnageants desdites cellules d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

10                47. Procédé, selon la revendication 46, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules monocytes ou macrophages ou dans les surnageants de ces cellules issues d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

15                48. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules ou dans les surnageants de ces cellules en culture, après un délai compris entre 6 et 12 jours de culture, préférentiellement après 9 jours.

20                49. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules, *in vivo* ou *ex vivo*, préférentiellement monocytes ou macrophages, dans des cerveaux de patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

25                50. Utilisation ou procédé, selon l'une quelconque des revendications 41 à 49, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune est la sclérose en plaques ou bien une forme (progressive, rémittente, rémittente-progressive) ou phase d'activité (poussées) de cette maladie.

30                51. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite

protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ  
5 ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les  
10 séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

15               52. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou autoimmune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les  
20 séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les  
25 fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlacan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine.  
30

53. Utilisation selon la revendication 51 ou 52, caractérisée en ce que le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

54. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

55. Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 54.

56. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la

séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

15               57. Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou autoimmune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 56.

20               58. Utilisation selon la revendication 54 ou 56, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

25               59. Utilisation selon la revendication 58, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

60. Utilisation selon la revendication 59, caractérisée en ce que les polypeptides sont choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

61. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

15

62. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59, SEQ ID N° 60, SEQ ID N° 61, SEQ ID N° 62, SEQ ID N° 63, SEQ ID N° 64, SEQ ID N° 65, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

20

63. Utilisation selon la revendication 61 ou 62, caractérisée en ce que la séquence nucléique est choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

25

30

64. Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou autoimmune.

## Lapins anti GM2

### ► Ganglioside GM2 activator

2 peptides de 13,15 acides aminés      lapins 189 190

1 peptide de 18 acides aminés lapin      191 et 192

**MQSLMQQAPLL IALGLLLATP AQAHLKKPSQ**

**LSSFSWDNCD EGKDPAVIRS STSVPLSSPL KVDLVLEKEV**

**PGNVTLSVG DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP**

**TGEPCPEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS**

**EFVVPDLELP SWLTTGNYRI ESQLSSSGKR  
LGCIKIQAASLKGI**

### GM2A

ATG CAG TCC CTG ATG CAG GCT CCC CTC CTG ATC GCC CTC GCG ACC CCT GCG CAA GCC CAC CTG  
 M Q S L H Q A P L I A L G L L A T P A Q A H L  
 CCA TCC CAG CTC AGT AGC TTT TCC TGG GAT AAC TGT GAT GAA GGG AGG GAC CCT GCG GTG ATC AGA AGC CTG ACT  
 P S Q L S S F S W D N G K D E G K D P A V I R S L T  
 CCT GAC CCC ATC GTC GTC CCT GGA AAT GTG ACC CTC AGT GTC GTC GGC AGC ACC AGT GTC CCC CTC AGT TCT CCT  
 P D P I V G N V T L S V G S T S V P L S S P  
 GTG GAT TTA GAT TTG GAG GAG GAG GTC GCT GGC CTC TGG ATC AAG CCA TGC ACA GAC TAC ATT GCC AGC TGT  
 V D I V L E K P V A G I W I K I P C T D Y I G S C  
 GAA CAC TTC TGT GAT GTG CTT GAC ATG TTA ATT CCT ACT GGG GAG CCC TCC CCA GAG CCC CTC CGT ACC TAT GGG  
 E H F C D V L D M I P T G E P C P E P L R T Y G  
 TGC CAC TGT CCC TTC AAA GAA GCA ACC TAC TCA CTG CCC AAG AGC GAA TTC GTT GTG CCT GAC CTC GAG CTG CCC  
 F C H C P F K E G T Y S L P K S E V V P D L E L P  
 CTC ACC ACC GGG AAC TAC CGC ATA GAG AGC GTC CTG AGC AGC Act CGG AAG CGT CTG GGC TGC ATC AAG ATC CCT  
 L T T G N Y R I E S V L S S V G K R C I K I A  
 CTA AAG GGC ATA  
 L K G I \*

FIG. 1

2/18

## Lapins anti MRP14

2 peptides de 13, 19 acides aminés lapin 193  
 1 peptide de 17 acides aminés lapin 195-196

**MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD**  
**TLNQGEFKEL VRKDLQLQNFLK KENKNEKVIE**  
**HIMEDDLDTN ADKQLLSFEEF IMLMARLTWA**  
**SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP**

MRP1

ATG ACT TGC AAA ATG TCG CAG CTG GAA CGC AAC ATA GAG ACC ATC ATC AAC ACC TTC CAC CAA TAC TAC TGT GTC AAG CTC V L G H  
 M T C K H S Q L E R N I E T F H Q Y S V K L G H  
 CTG AAC CAG GGG GAA TTC AAA GAG CTC GTG CGA AAA GAT CTC AAT TTT CTC AAG AAG GAG AAT GAA AAG GTC ATA  
 L N Q G E F K E L V R K D L Q N F L K K E N K N E K V I E  
 ATG GAG GAC GAC ACA ATG GCA GAC AAG CAG CTC ACC TTC GAG GAG TTC ATC ATG CTC ATG GCG AGG CTA ACC TGG GCC TCC CAC  
 M E D L D T N A D K Q L S F P I H L W A R L T W A S H  
 ATG CAC GAG GGT GAC GAG CCT GGC CAC CAC CAT AAG CCA GGC CTC GGG GAG GGC ACC CCC  
 H B G D E G P G H H K P G L G E G T

F.I.G. 2

3/18

## Lapin anti Saposine

3 peptides de 12,15, 15 acides aminés      lapin 74-75  
3 peptides de 12,15,15 acides aminés      lapin 72-73

**GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE**  
**HVKKECDRLG PGMAIDICKNY ISQYSEIAIQ**  
**MMMHMQDQQQP KEICALVGFC DEV**

Sap  
Arg GGG GAC GTT TGC ATT CAG GAC TGC ACT GAC ATC CAG ACT GCT GTC CGG ACC AAC TCC ACC CGG ACC AAC TCC ACC TTT GTC CAG  
GCC M G D V C Q D C I Q M V T D I Q T A V R T N S T F V Q  
A TGC GAA CAT GTC AAG GAG GAG TGT GAC CCG CCT GGC ATG GCC GAC ATA TGC AAG AAC TAT ATC AGC CAG TAT  
TGT L V E H V K E E C D R L G P G H A D I C K N Y I S Q Y  
I S G A A T T G C T C A G A T G C A C A T G C A A C C A G G A G G A T C T T C T C T G A T G A G T G A  
S E I A T Q W M H M Q P K E I C A L V G F C D E \* FIG. 3

4/18

# Dosage MRP 8

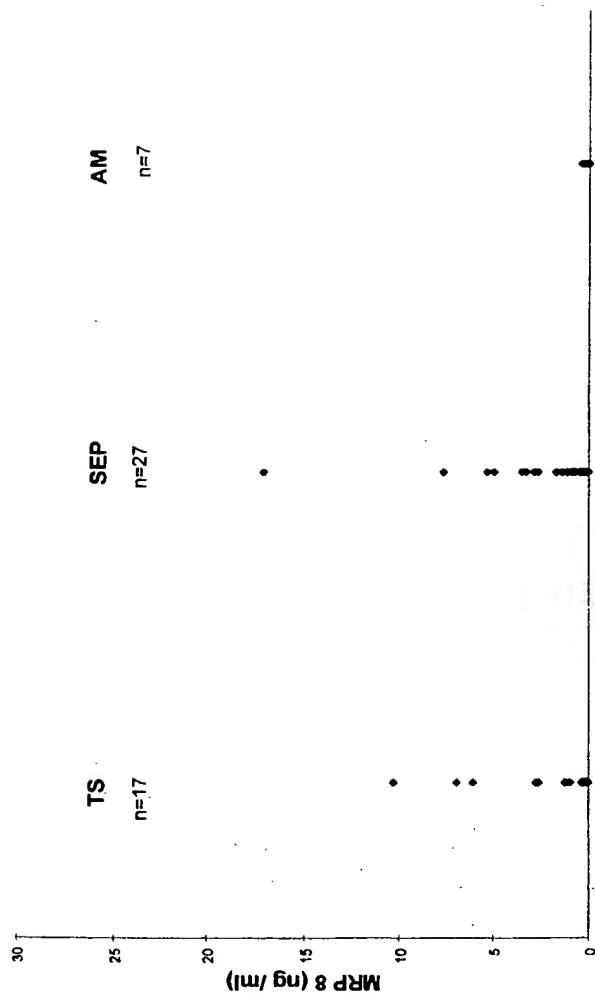


FIG. 4

5/18

# Dosage MRP14

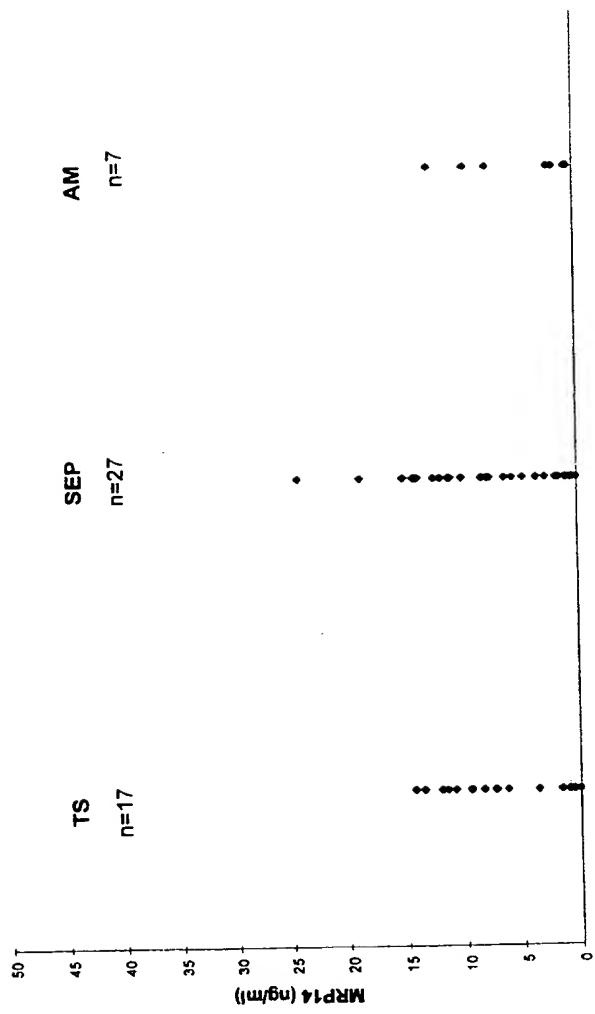


FIG. 5

6 / 18

# Dosage MRP8/14

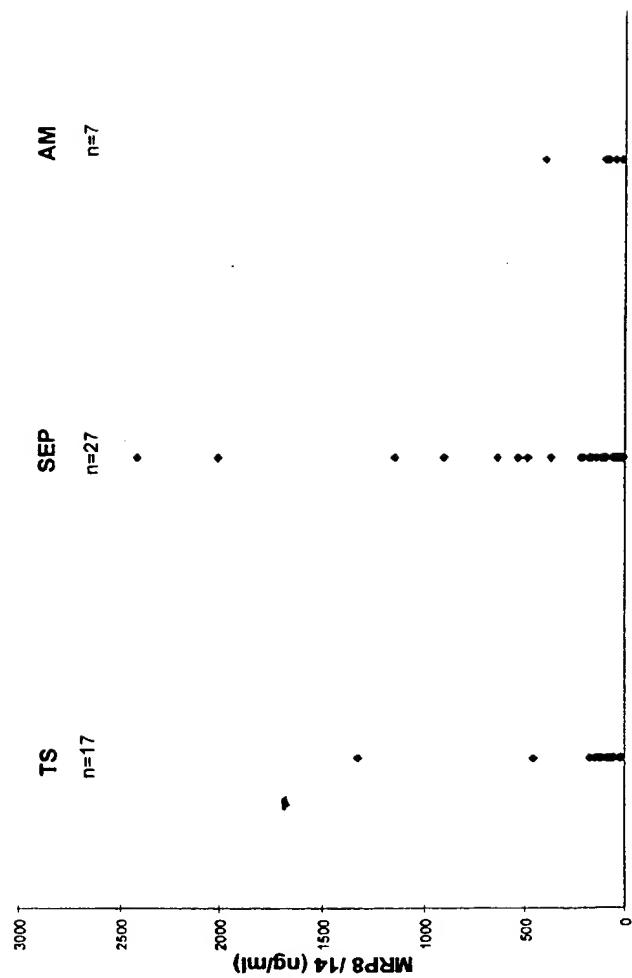


FIG. 6

7 / 18

## Taux urinaire moyen par catégorie de population

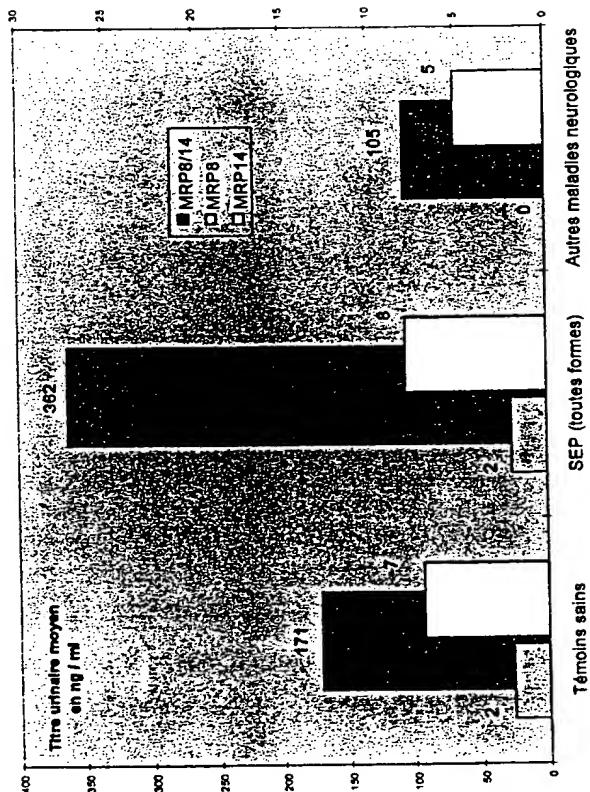
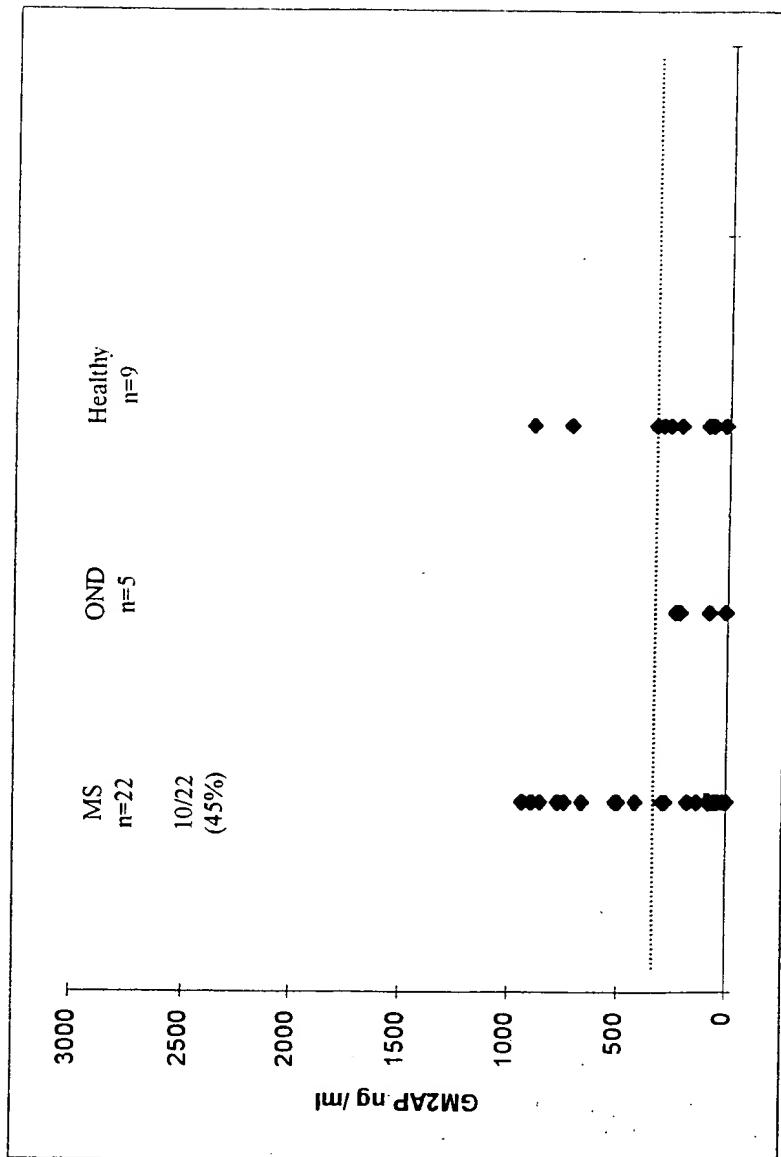
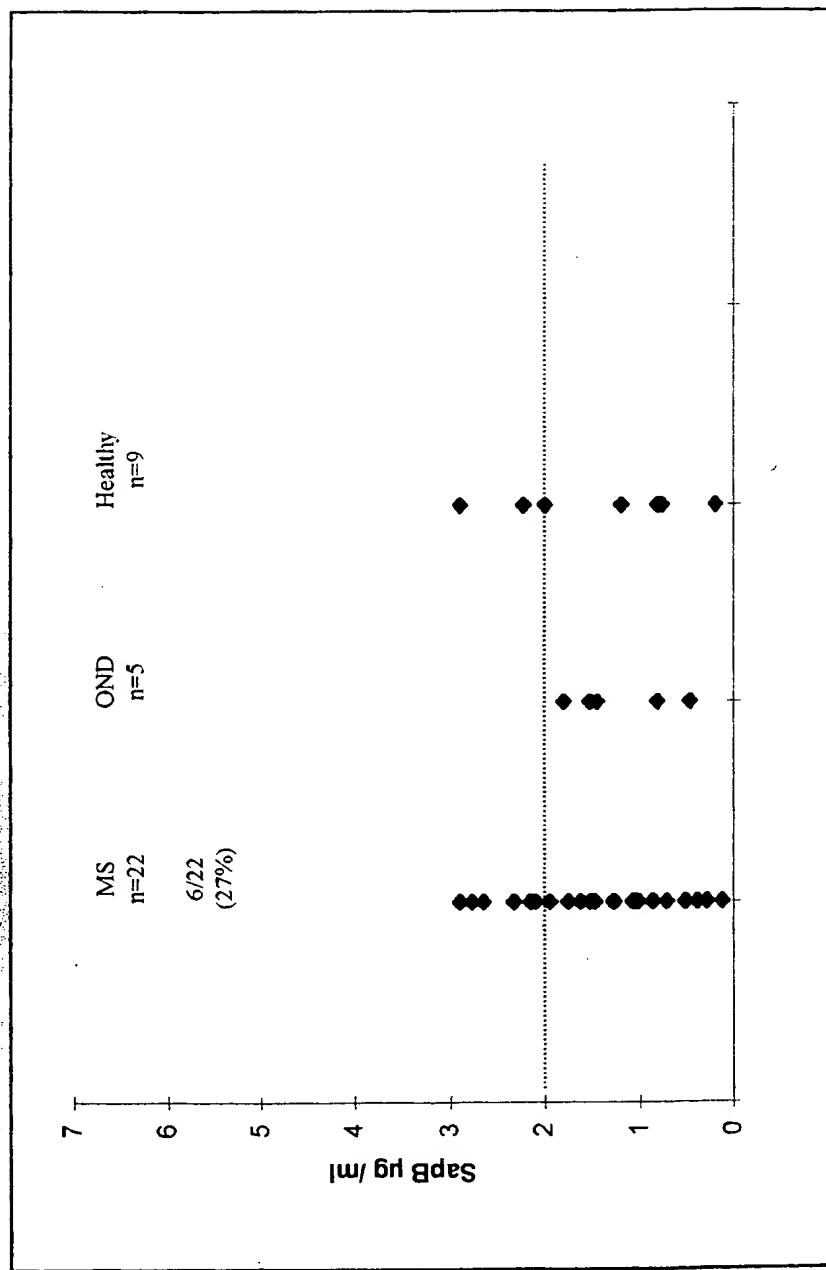


FIG. 7

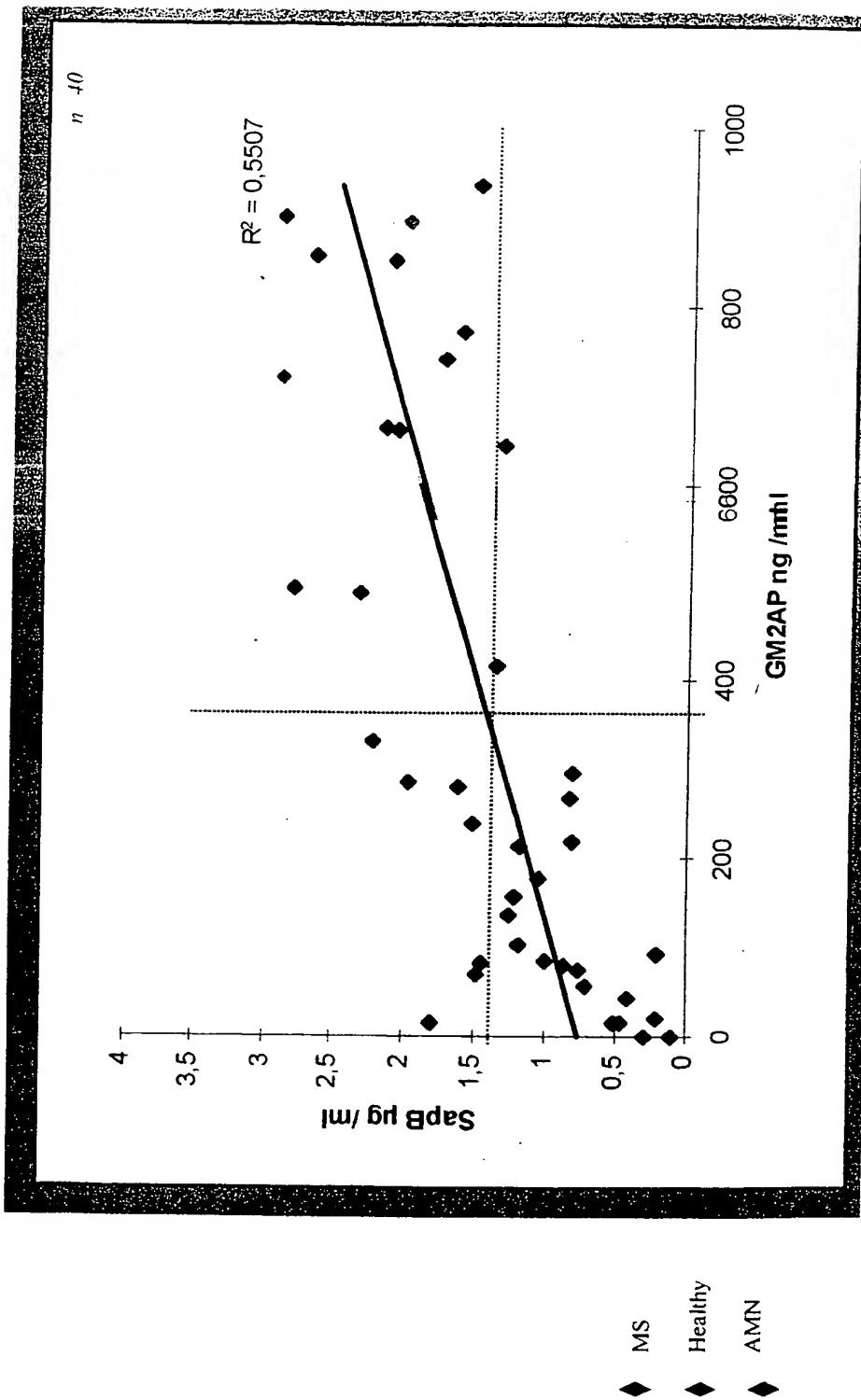
8/18

**Figure 8**

9/18

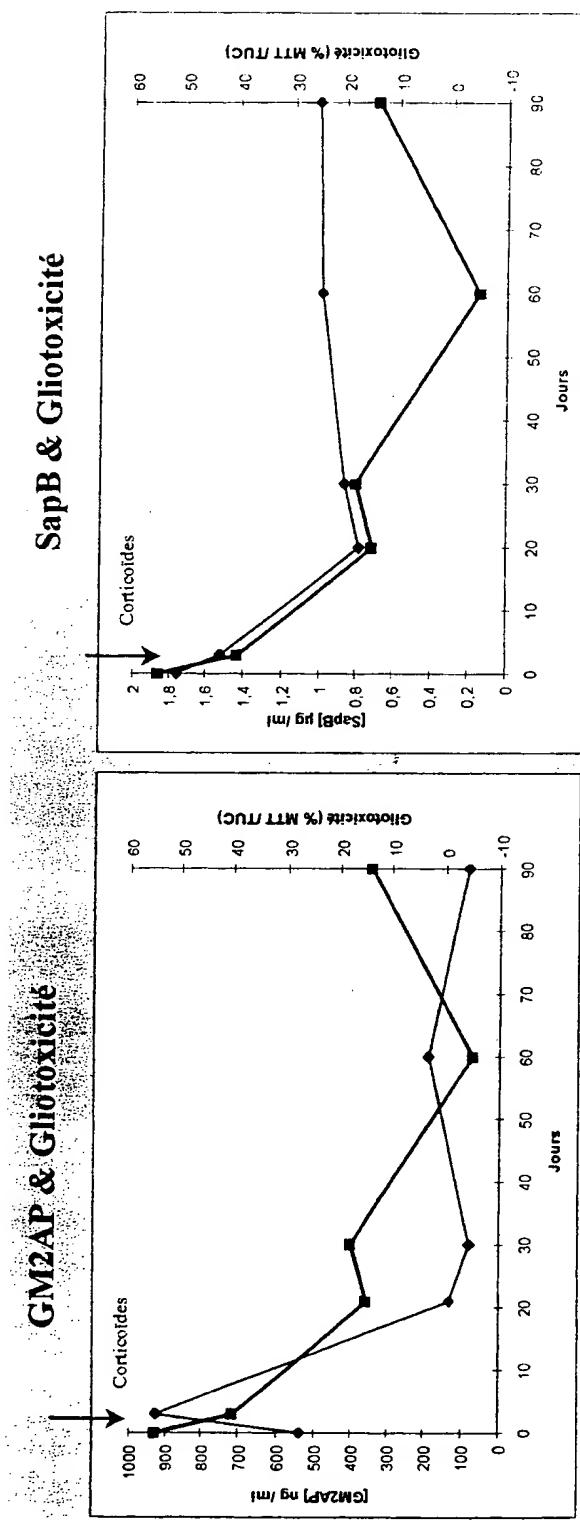
**Figure 9**

10/18

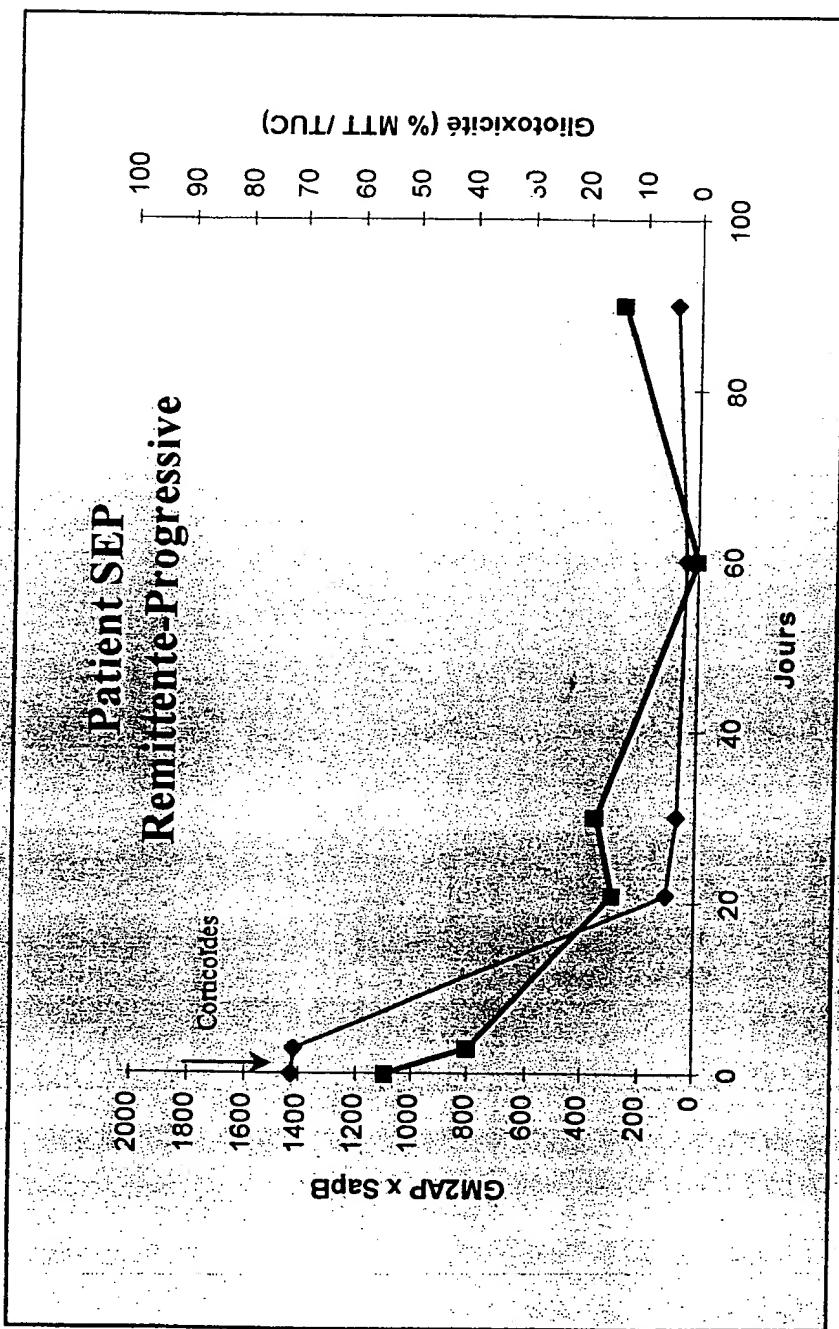
**Figure 10**

# Patient SEP forme Rémittent Progressive

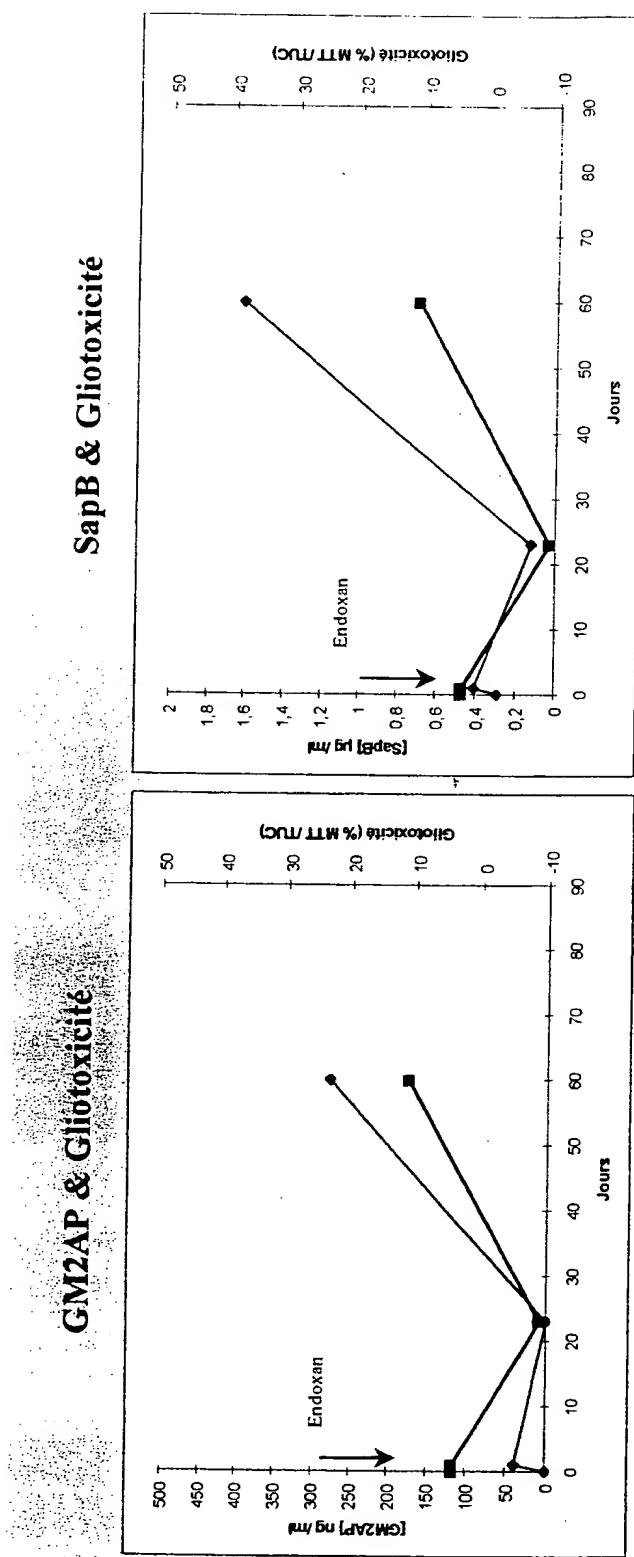
## Figure 11



12/18

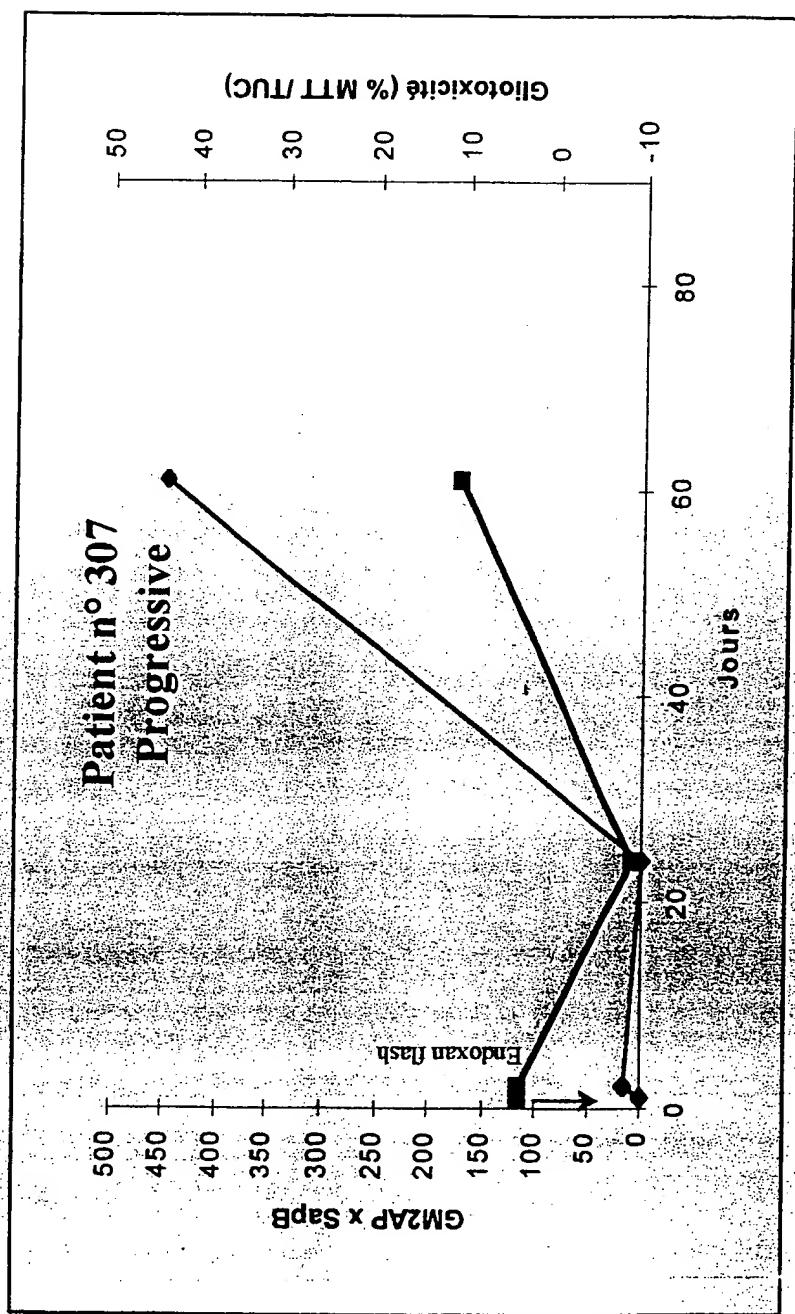
**Figure 12**

**Figure 13**  
**Patient SEP - Progressive**

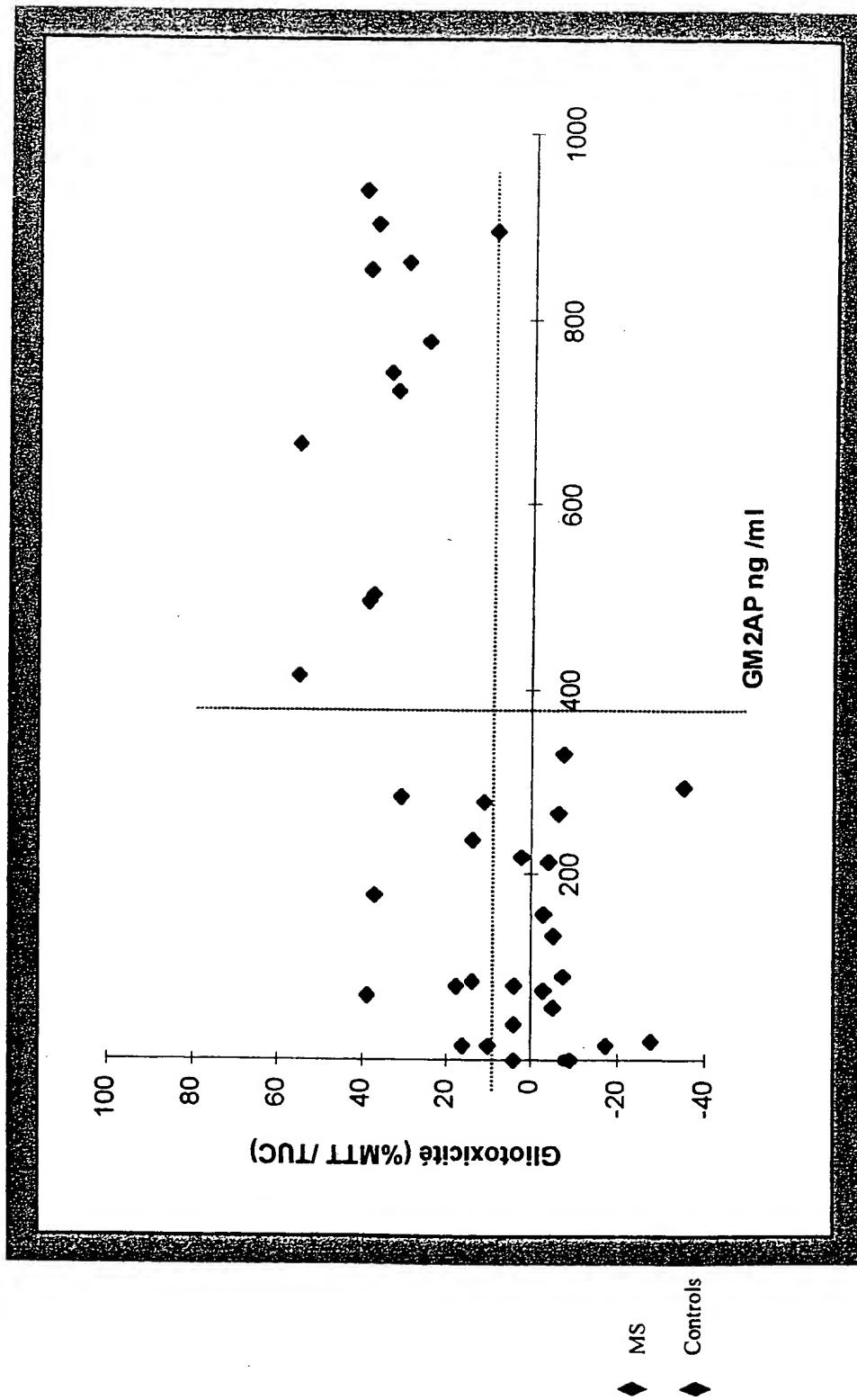


14/18

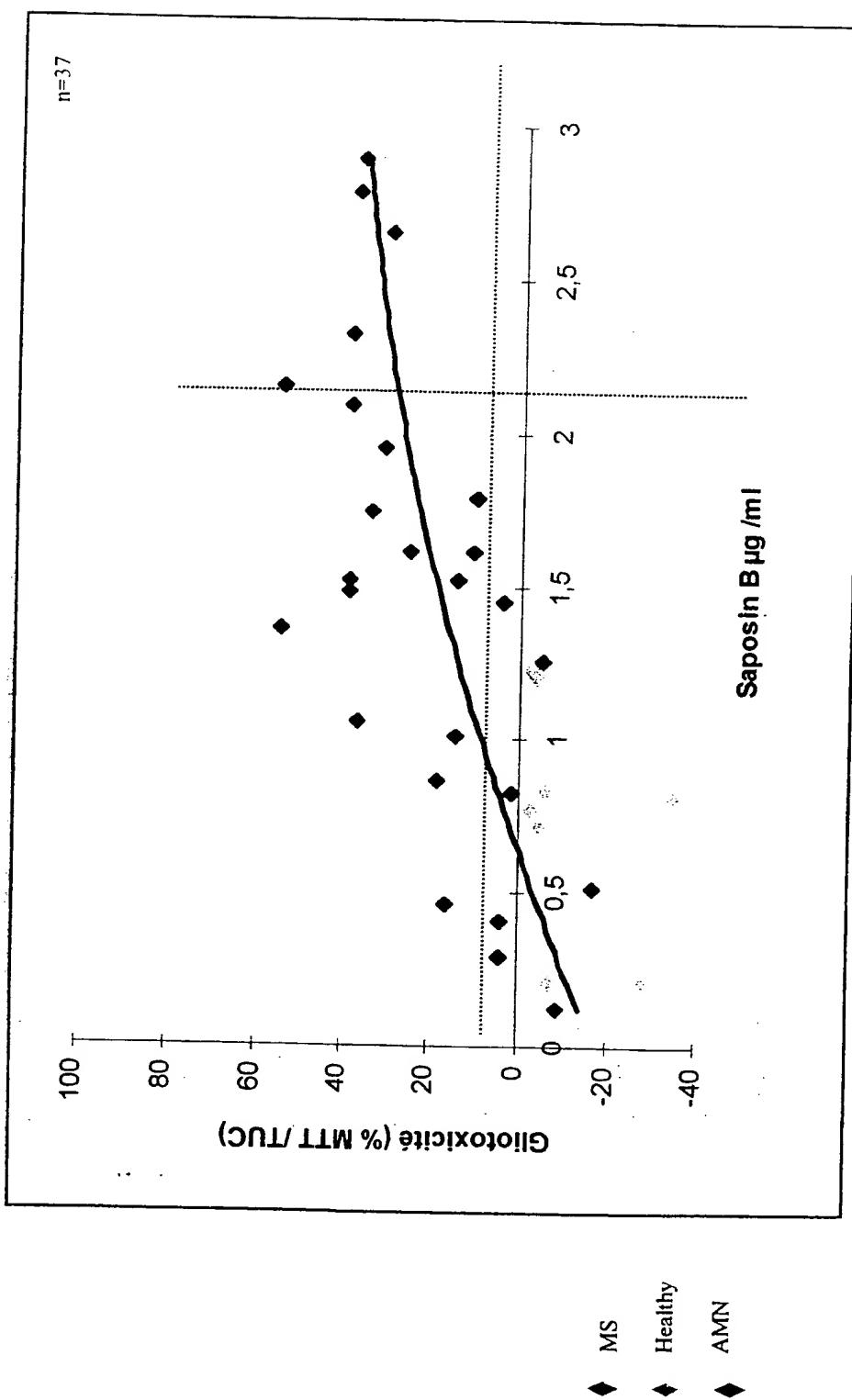
Figure 14



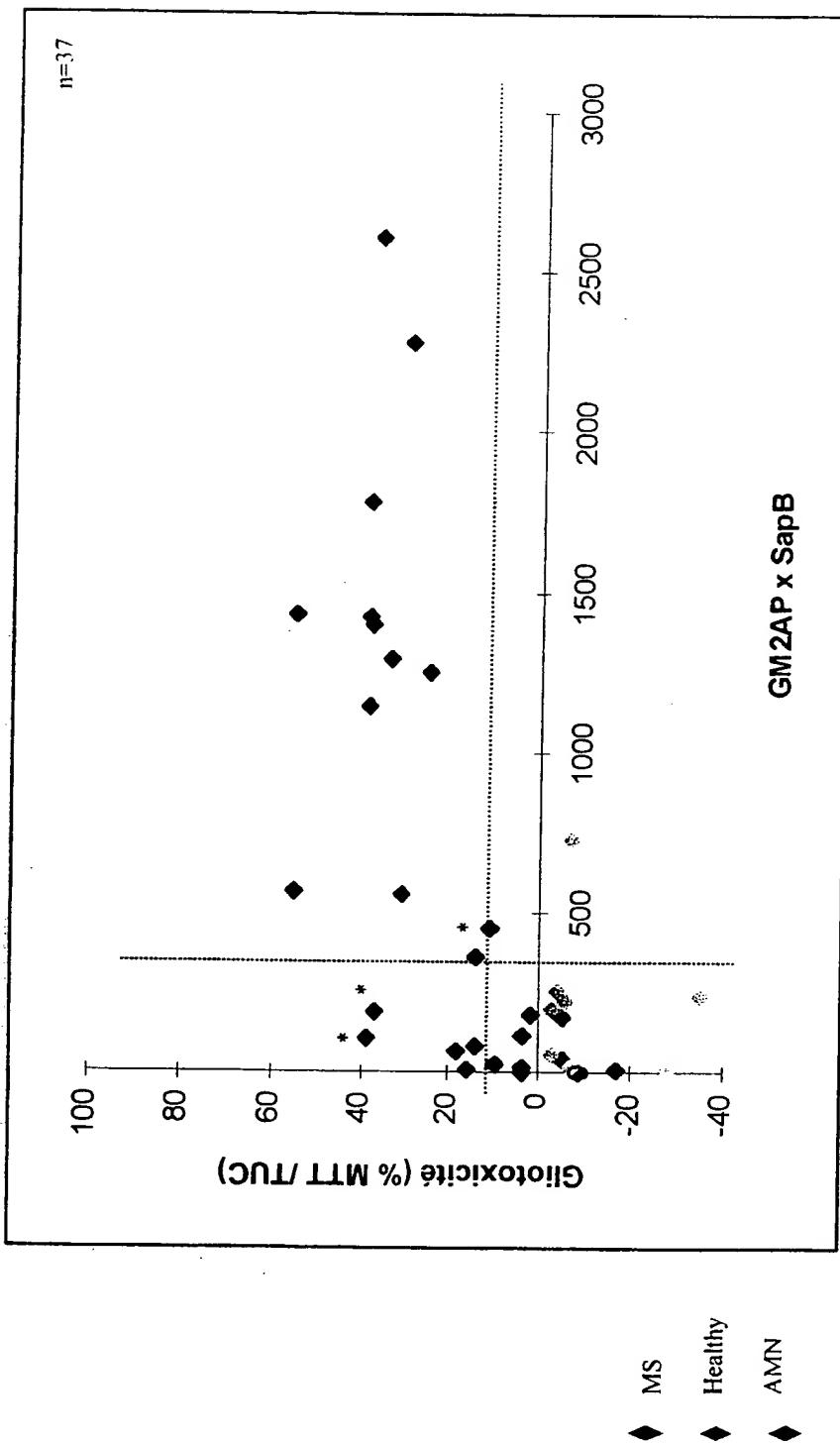
15/18

**Figure 15**

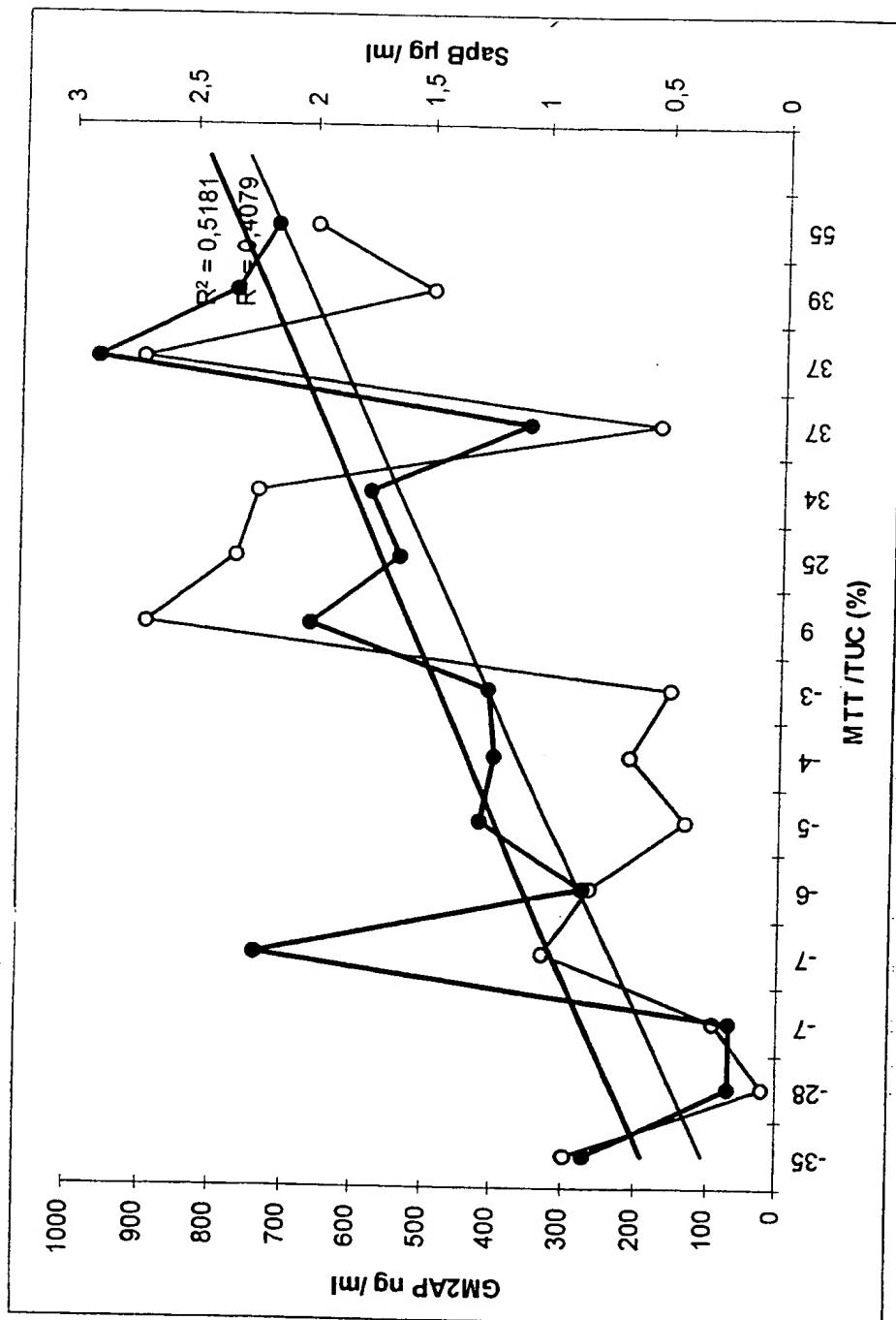
16/18

**Figure 16**

17/18

**Figure 17**

18/18

**Figure 18**

## LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOMERIEUX STELHYS  
5 <120> Utilisation d'un polypeptide pour détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative, neurologique ou auto-immune  
10 <130> SEP22  
<140>  
<141>  
15 <150> FR9909372  
<151> 1999-07-15  
<160> 75  
20 <170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 4393  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 1  
Met Gly Trp Arg Ala Pro Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu His  
1 5 10 15  
30 Gly Arg Leu Leu Ala Val Thr His Gly Leu Arg Ala Tyr Asp Gly Leu  
20 25 30  
Ser Leu Pro Glu Asp Ile Glu Thr Val Thr Ala Ser Gln Met Arg Trp  
35 40 45  
35 Thr His Ser Tyr Leu Ser Asp Asp Glu Asp Met Leu Ala Asp Ser Ile  
50 55 60  
40 Ser Gly Asp Asp Leu Gly Ser Gly Asp Leu Gly Ser Gly Asp Phe Gln  
65 70 75 80  
Met Val Tyr Phe Arg Ala Leu Val Asn Phe Thr Arg Ser Ile Glu Tyr  
85 90 95  
45 Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ala Gly Ser Arg Glu Phe Arg Glu Val Ser  
100 105 110  
Glu Ala Val Val Asp Thr Leu Glu Ser Glu Tyr Leu Lys Ile Pro Gly  
115 120 125  
50 Asp Gln Val Val Ser Val Val Phe Ile Lys Glu Leu Asp Gly Trp Val  
130 135 140  
55 Phe Val Glu Leu Asp Val Gly Ser Glu Gly Asn Ala Asp Gly Ala Gln  
145 150 155 160  
Ile Gln Glu Met Leu Leu Arg Val Ile Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser  
165 170 175

Tyr Val Thr Ser Pro Gln Gly Phe Gln Phe Arg Arg Leu Gly Thr Val  
 180 185 190  
 5 Pro Gln Phe Pro Arg Ala Cys Thr Glu Ala Glu Phe Ala Cys His Ser  
 195 200 205  
 Tyr Asn Glu Cys Val Ala Leu Glu Tyr Arg Cys Asp Arg Arg Pro Asp  
 210 215 220  
 10 Cys Arg Asp Met Ser Asp Glu Leu Asn Cys Glu Glu Pro Val Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Pro Thr Phe Ser Leu Leu Val Glu Thr Thr Ser Leu Pro Pro  
 15 245 250 255  
 Arg Pro Glu Thr Thr Ile Met Arg Gln Pro Pro Val Thr His Ala Pro  
 260 265 270  
 20 Gln Pro Leu Leu Pro Gly Ser Val Arg Pro Leu Pro Cys Gly Pro Gln  
 275 280 285  
 Glu Ala Ala Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Arg Asp Tyr Leu Cys  
 290 295 300  
 25 Asp Gly Gln Glu Asp Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Leu Asp Cys Gly  
 305 310 315 320  
 Pro Pro Pro Pro Cys Glu Pro Asn Glu Phe Pro Cys Gly Asn Gly His  
 325 330 335  
 Cys Ala Leu Lys Leu Trp Arg Cys Asp Gly Asp Phe Asp Cys Glu Asp  
 340 345 350  
 35 Arg Thr Asp Glu Ala Asn Cys Pro Thr Lys Arg Pro Glu Glu Val Cys  
 355 360 365  
 Gly Pro Thr Gln Phe Arg Cys Val Ser Thr Asn Met Cys Ile Pro Ala  
 370 375 380  
 40 Ser Phe His Cys Asp Glu Glu Ser Asp Cys Pro Asp Arg Ser Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Gly Cys Met Pro Pro Gln Val Val Thr Pro Pro Arg Glu Ser Ile  
 45 405 410 415  
 Gln Ala Ser Arg Gly Gln Thr Val Thr Phe Thr Cys Val Ala Ile Gly  
 420 425 430  
 50 Val Pro Ala Pro Phe Leu Ile Asn Trp Arg Leu Asn Trp Gly His Ile  
 435 440 445  
 Pro Ser Gln Pro Arg Val Thr Val Thr Ser Glu Gly Gly Arg Gly Thr  
 450 455 460  
 55 Leu Ile Ile Arg Asp Val Lys Glu Ser Asp Gln Gly Ala Tyr Thr Cys  
 465 470 475 480

Glu Ala Met Asn Ala Arg Gly Met Val Phe Gly Ile Pro Asp Gly Val  
485 490 495

Leu Glu Leu Val Pro Gln Arg Ala Gly Pro Cys Pro Asp Gly His Phe  
5 500 505 510

Tyr Leu Glu His Ser Ala Ala Cys Leu Pro Cys Phe Cys Phe Gly Ile  
515 520 525

10 Thr Ser Val Cys Gln Ser Thr Arg Arg Phe Arg Asp Gln Ile Arg Leu  
530 535 540

Arg Phe Asp Gln Pro Asp Asp Phe Lys Gly Val Asn Val Thr Met Pro  
545 550 555 560

15 Ala Gln Pro Gly Thr Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gln Leu Gln Ile Asp  
565 570 575

Pro Ser Leu His Glu Phe Gln Leu Val Asp Leu Ser Arg Arg Phe Leu  
20 580 585 590

Val His Asp Ser Phe Trp Ala Leu Pro Glu Gln Phe Leu Gly Asn Lys  
595 600 605

25 Val Asp Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Arg Tyr Asn Val Arg Tyr Glu Leu  
610 615 620

Ala Arg Gly Met Leu Glu Pro Val Gln Arg Pro Asp Val Val Leu Val  
625 630 635 640

30 Gly Ala Gly Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Gly His Thr Pro Thr Gln Pro  
645 650 655

Gly Ala Leu Asn Gln Arg Gln Val Gln Phe Ser Glu Glu His Trp Val  
35 660 665 670

His Glu Ser Gly Arg Pro Val Gln Arg Ala Glu Leu Leu Gln Val Leu  
675 680 685

40 Gln Ser Leu Glu Ala Val Leu Ile Gln Thr Val Tyr Asn Thr Lys Met  
690 695 700

Ala Ser Val Gly Leu Ser Asp Ile Ala Met Asp Thr Thr Val Thr His  
705 710 715 720

45 Ala Thr Ser His Gly Arg Ala His Ser Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro  
725 730 735

Ile Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Ser Cys Asp Ala His Phe Thr  
50 740 745 750

Arg Val Pro Gly Gly Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Gly Cys Ser Cys  
755 760 765

55 Asn Gly His Ala Ser Ser Cys Asp Pro Val Tyr Gly His Cys Leu Asn  
770 775 780

Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Pro Gln Cys Lys Lys Cys Lys Ala Gly

	785	790	795	800
	Phe Phe Gly Asp Ala Met Lys Ala Thr Ala Thr Ser Cys Arg Pro Cys			
5	805	810	815	
	Pro Cys Pro Tyr Ile Asp Ala Ser Arg Arg Phe Ser Asp Thr Cys Phe			
	820	825	830	
10	Leu Asp Thr Asp Gly Gln Ala Thr Cys Asp Ala Cys Ala Pro Gly Tyr			
	835	840	845	
	Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Glu Gly Asn Pro			
	850	855	860	
15	Ile Gln Pro Gly Gly Lys Cys Arg Pro Val Asn Gln Glu Ile Val Arg			
	865	870	875	880
	Cys Asp Glu Arg Gly Ser Met Gly Thr Ser Gly Glu Ala Cys Arg Cys			
	885	890	895	
20	Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ala Asp Arg Ser			
	900	905	910	
25	Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys Leu Lys Cys Phe Cys			
	915	920	925	
	Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser Trp Ser Arg Ala Gln			
	930	935	940	
30	Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe Ser Leu Thr Asn Ala			
	945	950	955	960
	Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe Ser Pro Thr Pro Gly			
	965	970	975	
35	Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu Ser Gly Pro Tyr Phe			
	980	985	990	
	Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys Val Thr Ser Tyr Gly			
40	995	1000	1005	
	Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser Gln Pro Gly Ser Thr			
	1010	1015	1020	
45	Pro Leu His Gly Gln Pro Leu Val Val Leu Gln Gly Asn Asn Ile Ile			
	1025	1030	1035	1040
	Leu Glu His His Val Ala Gln Glu Pro Ser Pro Gly Gln Pro Ser Thr			
	1045	1050	1055	
50	Phe Ile Val Pro Phe Arg Glu Gln Ala Trp Gln Arg Pro Asp Gly Gln			
	1060	1065	1070	
	Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala Gly Ile Asp Thr			
55	1075	1080	1085	
	Leu Leu Ile Arg Ala Ser Tyr Ala Gln Gln Pro Ala Glu Ser Arg Val			
	1090	1095	1100	

Ser Gly Ile Ser Met Asp Val Ala Val Pro Glu Glu Thr Gly Gln Asp  
1105 1110 1115 1120

5 Pro Ala Leu Glu Val Glu Gln Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Gly  
1125 1130 1135

Pro Ser Cys Gln Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Ser Gly  
1140 1145 1150

10 Leu Tyr Leu Gly Thr Cys Glu Arg Cys Ser Cys His Gly His Ser Glu  
1155 1160 1165

Ala Cys Glu Pro Glu Thr Gly Ala Cys Gln Gly Cys Gln His His Thr  
15 1170 1175 1180

Glu Gly Pro Arg Cys Glu Gln Cys Gln Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala  
1185 1190 1195 1200

20 Gln Arg Gly Thr Pro Gln Asp Cys Gln Leu Cys Pro Cys Tyr Gly Asp  
1205 1210 1215

Pro Ala Ala Gly Gln Ala Ala His Thr Cys Phe Leu Asp Thr Asp Gly  
1220 1225 1230

25 His Pro Thr Cys Asp Ala Cys Ser Pro Gly His Ser Gly Arg His Cys  
1235 1240 1245

Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Ser Gln Gly Gln Pro  
30 1250 1255 1260

Cys Gln Arg Asp Ser Gln Val Pro Gly Pro Ile Gly Cys Asn Cys Asp  
1265 1270 1275 1280

35 Pro Gln Gly Ser Val Ser Ser Gln Cys Asp Ala Ala Gly Gln Cys Gln  
1285 1290 1295

Cys Lys Ala Gln Val Glu Gly Leu Thr Cys Ser His Cys Arg Pro His  
40 1300 1305 1310

His Phe His Leu Ser Ala Ser Asn Pro Asp Gly Cys Leu Pro Cys Phe  
1315 1320 1325

Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser Ala Tyr Thr Arg His  
45 1330 1335 1340

Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe Gln Gly Phe Ala Leu  
1345 1350 1355 1360

50 Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly Glu Phe Thr Val Glu  
1365 1370 1375

Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly Asn Phe Ala Gln Leu  
55 1380 1385 1390

Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp Gln Leu Pro Glu Thr Tyr Gln Gly Asp  
1395 1400 1405

Lys Val Ala Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Arg Tyr Thr Leu Ser Tyr Thr  
 1410 1415 1420

Ala Gly Pro Gln Gly Ser Pro Leu Ser Asp Pro Asp Val Gln Ile Thr  
 5 1425 1430 1435 1440

Gly Asn Asn Ile Met Leu Val Ala Ser Gln Pro Ala Leu Gln Gly Pro  
 1445 1450 1455

10 Glu Arg Arg Ser Tyr Glu Ile Met Phe Arg Glu Glu Phe Trp Arg Arg  
 1460 1465 1470

Pro Asp Gly Gln Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala  
 1475 1480 1485

15 Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala Thr Phe Ser Ser Val Pro Leu  
 1490 1495 1500

Val Ala Ser Ile Ser Ala Val Ser Leu Glu Val Ala Gln Pro Gly Pro  
 20 1505 1510 1515 1520

Ser Asn Arg Pro Arg Ala Leu Glu Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro Pro  
 1525 1530 1535

25 Gly Tyr Ile Gly Leu Ser Cys Gln Asp Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Arg  
 1540 1545 1550

Thr Gly Ser Gly Leu Tyr Leu Gly His Cys Glu Leu Cys Glu Cys Asn  
 30 1555 1560 1565

Gly His Ser Asp Leu Cys His Pro Glu Thr Gly Ala Cys Ser Gln Cys  
 1570 1575 1580

Gln His Asn Ala Ala Gly Glu Phe Cys Glu Leu Cys Ala Pro Gly Tyr  
 35 1585 1590 1595 1600

Tyr Gly Asp Ala Thr Ala Gly Thr Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala  
 1605 1610 1615

40 Cys Pro Leu Thr Asn Pro Glu Asn Met Phe Ser Arg Thr Cys Glu Ser  
 1620 1625 1630

Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr  
 45 1635 1640 1645

Gly Gln Tyr Cys Glu Gln Cys Gly Pro Gly Tyr Val Gly Asn Pro Ser  
 1650 1655 1660

Val Gln Gly Gln Cys Leu Pro Glu Thr Asn Gln Ala Pro Leu Val  
 50 1665 1670 1675 1680

Val Glu Val His Pro Ala Arg Ser Ile Val Pro Gln Gly Gly Ser His  
 1685 1690 1695

55 Ser Leu Arg Cys Gln Val Ser Gly Arg Gly Pro His Tyr Phe Tyr Trp  
 1700 1705 1710

Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Val Pro Ser Gly Thr Gln Gln Arg His

	1715	1720	1725
	Gln Gly Ser Glu Leu His Phe Pro Ser Val Gln Pro Ser Asp Ala Gly		
	1730	1735	1740
5	Val Tyr Ile Cys Thr Cys Arg Asn Leu His Arg Ser Asn Thr Ser Arg		
	1745	1750	1755
	Ala Glu Leu Leu Val Thr Glu Ala Pro Ser Lys Pro Ile Thr Val Thr		
10	1765	1770	1775
	Val Glu Glu Gln Arg Ser Gln Ser Val Arg Pro Gly Ala Asp Val Thr		
	1780	1785	1790
15	Phe Ile Cys Thr Ala Lys Ser Lys Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Trp		
	1795	1800	1805
	Thr Arg Leu His Asn Gly Lys Leu Pro Thr Arg Ala Met Asp Phe Asn		
	1810	1815	1820
20	Gly Ile Leu Thr Ile Arg Asn Val Gln Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr		
	1825	1830	1835
	Val Cys Thr Gly Ser Asn Met Phe Ala Met Asp Gln Gly Thr Ala Thr		
25	1845	1850	1855
	Leu His Val Gln Ala Ser Gly Thr Leu Ser Ala Pro Val Val Ser Ile		
	1860	1865	1870
30	His Pro Pro Gln Leu Thr Val Gln Pro Gly Gln Leu Ala Glu Phe Arg		
	1875	1880	1885
	Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Thr Pro Thr Leu Glu Trp Thr Gly Gly		
	1890	1895	1900
35	Pro Gly Gly Gln Leu Pro Ala Lys Ala Gln Ile His Gly Gly Ile Leu		
	1905	1910	1915
	Arg Leu Pro Ala Val Glu Pro Thr Asp Gln Ala Gln Tyr Leu Cys Arg		
40	1925	1930	1935
	Ala His Ser Ser Ala Gly Gln Gln Val Ala Arg Ala Val Leu His Val		
	1940	1945	1950
45	His Gly Gly Gly Pro Arg Val Gln Val Ser Pro Glu Arg Thr Gln		
	1955	1960	1965
	Val His Ala Gly Arg Thr Val Arg Leu Tyr Cys Arg Ala Ala Gly Val		
	1970	1975	1980
50	Pro Ser Ala Thr Ile Thr Trp Arg Lys Glu Gly Gly Ser Leu Pro Pro		
	1985	1990	1995
	Gln Ala Arg Ser Glu Arg Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Ile Pro Ala		
55	2005	2010	2015
	Ile Thr Thr Ala Asp Ala Gly Phe Tyr Leu Cys Val Ala Thr Ser Pro		
	2020	2025	2030

Ala Gly Thr Ala Gln Ala Arg Ile Gln Val Val Val Leu Ser Ala Ser  
 2035 2040 2045

5 Asp Ala Ser Gln Pro Pro Val Lys Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ser Val  
 2050 2055 2060

Thr Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala Gly Ser Ala  
 2065 2070 2075 2080

10 His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Arg Arg Gly Gly Ser Leu Pro His His  
 2085 2090 2095

Thr Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gln Val Ser Pro Ala  
 15 2100 2105 2110

Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Glu Asn Gly Ser Gly Pro Lys  
 2115 2120 2125

20 Glu Ala Ser Ile Thr Val Ser Val Leu His Gly Thr His Ser Gly Pro  
 2130 2135 2140

Ser Tyr Thr Pro Val Pro Gly Ser Thr Arg Pro Ile Arg Ile Glu Pro  
 2145 2150 2155 2160

25 Ser Ser Ser His Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val  
 2165 2170 2175

Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly  
 30 2180 2185 2190

Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu His  
 2195 2200 2205

35 Gln Val Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Val Gly  
 2210 2215 2220

Thr Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser  
 2225 2230 2235 2240

40 Val Ile Pro Gly Pro Ile Pro Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser  
 2245 2250 2255

Thr Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Ser Cys Val Val Ala Gly  
 45 2260 2265 2270

Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro  
 2275 2280 2285

50 Ala Arg His Gln Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr Ile Phe Gln Ala Ser  
 2290 2295 2300

Pro Ala Asp Ala Gly Gln Tyr Val Cys Arg Ala Ser Asn Gly Met Glu  
 2305 2310 2315 2320

55 Ala Ser Ile Thr Val Thr Val Thr Gly Thr Gln Gly Ala Asn Leu Ala  
 2325 2330 2335

Tyr Pro Ala Gly Ser Thr Gln Pro Ile Arg Ile Glu Pro Ser Ser Ser  
2340 2345 2350

5 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly  
2355 2360 2365

Gln Ser His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro  
2370 2375 2380

10 Val Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Ala Ser  
2385 2390 2395 2400

Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Leu Gly Ser Ser Val  
2405 2410 2415

15 Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Pro Ala Gly Ser Val  
2420 2425 2430

Pro Ala Leu Gly Val Thr Pro Thr Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser  
20 2435 2440 2445

Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala Gly  
2450 2455 2460

25 Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Ser Leu Pro  
2465 2470 2475 2480

Ala Arg His Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu Gln Val Thr  
2485 2490 2495

30 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Val Gly Ser Ser Gly  
2500 2505 2510

Thr Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Gln Gln Arg Leu Ser Gly  
35 2515 2520 2525

Ser His Ser Gln Gly Val Ala Tyr Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser  
2530 2535 2540

40 Ala Ser Leu Ala Asn Gly His Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala  
2545 2550 2555 2560

Ser Gln Ala Pro His Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu  
2565 2570 2575

45 Pro Ser Arg His Gln Ile Val Gly Ser Arg Leu Arg Ile Pro Gln Val  
2580 2585 2590

50 Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Ser Asn Gly Ala  
2595 2600 2605

Gly Ser Arg Glu Thr Ser Leu Ile Val Thr Ile Gln Gly Ser Gly Ser  
2610 2615 2620

55 Ser His Val Pro Arg Val Ser Pro Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser Ser  
2625 2630 2635 2640

Pro Thr Val Val Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala

	2645	2650	2655
	Arg Gln Pro Gln Ala Ile Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu		
5	2660	2665	2670
	Pro Ser Arg His Gln Thr His Gly Ser His Leu Arg Leu His Gln Met		
	2675	2680	2685
10	Ser Val Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Ala Asn Asn Asn Ile		
	2690	2695	2700
	Asp Ala Leu Glu Ala Ser Ile Val Ile Ser Val Ser Pro Ser Ala Gly		
	2705	2710	2715
15	Ser Pro Ser Ala Pro Gly Ser Ser Met Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser		
	2725	2730	2735
	Ser Ser His Val Ala Glu Gly Glu Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val		
20	2740	2745	2750
	Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser		
	2755	2760	2765
25	Leu Pro Ser Tyr His Gln Thr Arg Gly Ser Arg Leu Arg Leu His His		
	2770	2775	2780
	Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Met Gly Ser		
	2785	2790	2795
30	Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser Gly		
	2805	2810	2815
	Ser Ser Ala Val His Val Pro Ala Pro Gly Gly Ala Pro Pro Ile Arg		
35	2820	2825	2830
	Ile Glu Pro Ser Ser Arg Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu		
	2835	2840	2845
40	Lys Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys		
	2850	2855	2860
	Arg Gly Gly Asn Leu Pro Ala Arg His Gln Val His Gly Pro Leu Leu		
	2865	2870	2875
45	2880		
	Arg Leu Asn Gln Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Cys Gln		
	2885	2890	2895
	Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile		
50	2900	2905	2910
	Glu Pro Ser Ser Pro Gly Pro Ile Pro Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro		
	2915	2920	2925
55	Ile Tyr Ile Glu Ala Ser Ser Ser His Val Thr Glu Gly Gln Thr Leu		
	2930	2935	2940
	Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp		
	2945	2950	2955
	2960		

Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser  
 2965 2970 2975  
 5 Gln Leu Arg Leu His His Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val  
 2980 2985 2990  
 Cys Arg Ala Ala Gly Gly Pro Gly Pro Glu Gln Glu Ala Ser Phe Thr  
 2995 3000 3005  
 10 Val Thr Val Pro Pro Ser Glu Gly Ser Ser Tyr Arg Leu Arg Ser Pro  
 3010 3015 3020  
 Val Ile Ser Ile Asp Pro Pro Ser Ser Thr Val Gln Gln Gly Gln Asp  
 15 3025 3030 3035 3040  
 Ala Ser Phe Lys Cys Leu Ile His Asp Gly Ala Ala Pro Ile Ser Leu  
 3045 3050 3055  
 20 Glu Trp Lys Thr Arg Asn Gln Glu Leu Glu Asp Asn Val His Ile Ser  
 3060 3065 3070  
 Pro Asn Gly Ser Ile Ile Thr Ile Val Gly Thr Arg Pro Ser Asn His  
 3075 3080 3085  
 25 Gly Thr Tyr Arg Cys Val Ala Ser Asn Ala Tyr Gly Val Ala Gln Ser  
 3090 3095 3100  
 Val Val Asn Leu Ser Val His Gly Pro Pro Thr Val Ser Val Leu Pro  
 30 3105 3110 3115 3120  
 Glu Gly Pro Val Trp Val Lys Val Gly Lys Ala Val Thr Leu Glu Cys  
 3125 3130 3135  
 35 Val Ser Ala Gly Glu Pro Arg Ser Ser Ala Arg Trp Thr Arg Ile Ser  
 3140 3145 3150  
 Ser Thr Pro Ala Lys Leu Glu Gln Arg Thr Tyr Gly Leu Met Asp Ser  
 3155 3160 3165  
 40 His Thr Val Leu Gln Ile Ser Ser Ala Lys Pro Ser Asp Ala Gly Thr  
 3170 3175 3180  
 Tyr Val Cys Leu Ala Gln Asn Ala Leu Gly Thr Ala Gln Lys Gln Val  
 45 3185 3190 3195 3200  
 Glu Val Ile Val Asp Thr Gly Ala Met Ala Pro Gly Ala Pro Gln Val  
 3205 3210 3215  
 50 Gln Ala Glu Glu Ala Glu Leu Thr Val Glu Ala Gly His Thr Ala Thr  
 3220 3225 3230  
 Leu Arg Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Ala Arg Thr Ile His Trp Ser  
 3235 3240 3245  
 55 Lys Leu Arg Ser Pro Leu Pro Trp Gln His Arg Leu Glu Gly Asp Thr  
 3250 3255 3260

Leu Ile Ile Pro Arg Val Ala Gln Gln Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Cys  
 3265                    3270                    3275                    3280  
  
 5 Asn Ala Thr Ser Pro Ala Gly His Ala Glu Ala Thr Ile Ile Leu His  
       3285                    3290                    3295  
  
 Val Glu Ser Pro Pro Tyr Ala Thr Thr Val Pro Glu His Ala Ser Val  
       3300                    3305                    3310  
  
 10 Gln Ala Gly Glu Thr Val Gln Leu Gln Cys Leu Ala His Gly Thr Pro  
       3315                    3320                    3325  
  
 Pro Leu Thr Phe Gln Trp Ser Arg Val Gly Ser Ser Leu Pro Gly Arg  
       3330                    3335                    3340  
  
 15 Ala Thr Ala Arg Asn Glu Leu Leu His Phe Glu Arg Ala Ala Pro Glu  
       3345                    3350                    3355                    3360  
  
 Asp Ser Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Val Thr Asn Lys Val Gly Ser Ala  
 20        3365                    3370                    3375  
  
 Glu Ala Phe Ala Gln Leu Leu Val Gln Gly Pro Pro Gly Ser Leu Pro  
       3380                    3385                    3390  
  
 25 Ala Thr Ser Ile Pro Ala Gly Ser Thr Pro Thr Val Gln Val Thr Pro  
       3395                    3400                    3405  
  
 Gln Leu Glu Thr Lys Ser Ile Gly Ala Ser Val Glu Phe His Cys Ala  
       3410                    3415                    3420  
  
 30 Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Gln Leu Arg Trp Phe Lys Glu Gly Gly  
       3425                    3430                    3435                    3440  
  
 Gln Leu Pro Pro Gly His Ser Val Gln Asp Gly Val Leu Arg Ile Gln  
 35        3445                    3450                    3455  
  
 Asn Leu Asp Gln Ser Cys Gln Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Ala His Gly  
       3460                    3465                    3470  
  
 40 Pro Trp Gly Lys Ala Gln Ala Ser Ala Gln Leu Val Ile Gln Ala Leu  
       3475                    3480                    3485  
  
 Pro Ser Val Leu Ile Asn Ile Arg Thr Ser Val Gln Thr Val Val Val  
       3490                    3495                    3500  
  
 45 Gly His Ala Val Glu Phe Glu Cys Leu Ala Leu Gly Asp Pro Lys Pro  
       3505                    3510                    3515                    3520  
  
 Gln Val Thr Trp Ser Lys Val Gly Gly His Leu Arg Pro Gly Ile Val  
 50        3525                    3530                    3535  
  
 Gln Ser Gly Gly Val Val Arg Ile Ala His Val Glu Leu Ala Asp Ala  
       3540                    3545                    3550  
  
 55 Gly Gln Tyr Arg Cys Thr Ala Thr Asn Ala Ala Gly Thr Thr Gln Ser  
       3555                    3560                    3565  
  
 His Val Leu Leu Leu Val Gln Ala Leu Pro Gln Ile Ser Met Pro Gln

	3570	3575	3580	
	Glu Val Arg Val Pro Ala Gly Ser Ala Ala Val Phe Pro Cys Ile Ala			
	3585	3590	3595	3600
5	Ser Gly Tyr Pro Thr Pro Asp Ile Ser Trp Ser Lys Leu Asp Gly Ser			
	3605	3610	3615	
	Leu Pro Pro Asp Ser Arg Leu Glu Asn Asn Met Leu Met Leu Pro Ser			
10	3620	3625	3630	
	Val Gln Pro Gln Asp Ala Gly Thr Tyr Val Cys Thr Ala Thr Asn Arg			
	3635	3640	3645	
15	Gln Gly Lys Val Lys Ala Phe Ala His Leu Gln Val Pro Glu Arg Val			
	3650	3655	3660	
	Val Pro Tyr Phe Thr Gln Thr Pro Tyr Ser Phe Leu Pro Leu Pro Thr			
	3665	3670	3675	3680
20	Ile Lys Asp Ala Tyr Arg Lys Phe Glu Ile Lys Ile Thr Phe Arg Pro			
	3685	3690	3695	
	Asp Ser Ala Asp Gly Met Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Arg Val Pro			
25	3700	3705	3710	
	Gly Ser Pro Thr Asn Leu Ala Asn Arg Gln Pro Asp Phe Ile Ser Phe			
	3715	3720	3725	
30	Gly Leu Val Gly Gly Arg Pro Glu Phe Arg Phe Asp Ala Gly Ser Gly			
	3730	3735	3740	
	Met Ala Thr Ile Arg His Pro Thr Pro Leu Ala Leu Gly His Phe His			
	3745	3750	3755	3760
35	Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser Leu Thr Gln Gly Ser Leu Ile Val Gly			
	3765	3770	3775	
	Asp Leu Ala Pro Val Asn Gly Thr Ser Gln Gly Lys Phe Gln Gly Leu			
40	3780	3785	3790	
	Asp Leu Asn Glu Glu Leu Tyr Leu Gly Gly Tyr Pro Asp Tyr Gly Ala			
	3795	3800	3805	
45	Ile Pro Lys Ala Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ile Gly Cys Val Arg Glu			
	3810	3815	3820	
	Leu Arg Ile Gln Gly Glu Glu Ile Val Phe His Asp Leu Asn Leu Thr			
	3825	3830	3835	3840
50	Ala His Gly Ile Ser His Cys Pro Thr Cys Arg Asp Arg Pro Cys Gln			
	3845	3850	3855	
	Asn Gly Gly Gln Cys His Asp Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Val Cys Val			
55	3860	3865	3870	
	Cys Pro Ala Gly Phe Thr Gly Ser Arg Cys Glu His Ser Gln Ala Leu			
	3875	3880	3885	

His Cys His Pro Glu Ala Cys Gly Pro Asp Ala Thr Cys Val Asn Arg  
 3890                    3895                    3900  
  
 5 Pro Asp Gly Arg Gly Tyr Thr Cys Arg Cys His Leu Gly Arg Ser Gly  
 3905                    3910                    3915                    3920  
  
 Leu Arg Cys Glu Glu Gly Val Thr Val Thr Thr Pro Ser Leu Ser Gly  
 10                    3925                    3930                    3935  
 Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Leu Pro Ala Leu Thr Asn Thr His His Glu  
 3940                    3945                    3950  
  
 Leu Arg Leu Asp Val Glu Phe Lys Pro Leu Ala Pro Asp Gly Val Leu  
 15                    3955                    3960                    3965  
  
 Leu Phe Ser Gly Gly Lys Ser Gly Pro Val Glu Asp Phe Val Ser Leu  
 3970                    3975                    3980  
  
 Lea Met Val Gly Gly His Leu Glu Phe Arg Tyr Glu Leu Gly Ser Gly  
 20                    3985                    3990                    3995                    4000  
  
 Leu Ala Val Leu Arg Thr Ala Glu Pro Leu Ala Leu Gly Arg Trp His  
 4005                    4010                    4015  
 25 Arg Val Ser Ala Glu Arg Leu Asn Lys Asp Gly Ser Leu Arg Val Asn  
 4020                    4025                    4030  
  
 Gly Gly Arg Pro Val Leu Arg Ser Ser Pro Gly Lys Ser Gln Gly Leu  
 30                    4035                    4040                    4045  
  
 Asn Leu His Thr Leu Leu Tyr Leu Gly Gly Val Glu Pro Ser Val Pro  
 4050                    4055                    4060  
  
 35 Leu Ser Pro Ala Thr Asn Met Ser Ala His Phe Arg Gly Cys Val Gly  
 4065                    4070                    4075                    4080  
  
 Glu Val Ser Val Asn Gly Lys Arg Leu Asp Leu Thr Tyr Ser Phe Leu  
 4085                    4090                    4095  
 40 Gly Ser Gln Gly Ile Gly Gln Cys Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu Arg  
 4100                    4105                    4110  
  
 Gln Pro Cys Gln His Gly Ala Thr Cys Met Pro Ala Gly Glu Tyr Glu  
 45                    4115                    4120                    4125  
  
 Phe Gln Cys Leu Cys Arg Asp Gly Ile Lys Gly Asp Leu Cys Glu His  
 4130                    4135                    4140  
  
 50 Glu Glu Asn Pro Cys Gln Leu Arg Glu Pro Cys Leu His Gly Gly Thr  
 4145                    4150                    4155                    4160  
  
 Cys Gln Gly Thr Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly Pro Arg  
 4165                    4170                    4175  
 55 Cys Gln Gln Gly Ser Gly His Gly Ile Ala Glu Ser Asp Trp His Leu  
 4180                    4185                    4190

Glu Gly Ser Gly Gly Asn Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe  
 4195 4200 4205

His Asp Asp Gly Phe Leu Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser  
 5 4210 4215 4220

Leu Pro Glu Val Pro Glu Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr  
 4225 4230 4235 4240

Ala Ser Gly Leu Leu Leu Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly  
 10 4245 4250 4255

Gln Gly Lys Asp Phe Ile Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His. Leu Val  
 4260 4265 4270

Phe Arg Tyr Gln Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp  
 15 4275 4280 4285

Pro Ile Asn Asp Gly Glu Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly  
 20 4290 4295 4300

Arg Arg Gly Ser Ile Gln Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg  
 4305 4310 4315 4320

Ser Pro Gly Pro Asn Val Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Ile Tyr Ile  
 25 4325 4330 4335

Gly Gly Ala Pro Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser  
 4340 4345 4350

Gly Ile Thr Gly Cys Val Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro  
 30 4355 4360 4365

Gly Ala Pro Pro Pro Gln Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala  
 35 4370 4375 4380

Gly Ala Asn Thr Arg Pro Cys Pro Ser  
 4385 4390

40

<210> 2  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe His Asp Asp Gly Phe Leu  
 1 5 10 15

Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser Leu Pro Glu Val Pro Glu  
 50 20 25 30

Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr Ala Ser Gly Leu Leu Leu  
 55 35 40 45

Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly Gln Gly Lys Asp Phe Ile  
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val Phe Arg Tyr Gln Leu Gly  
 65 70 75 80

5 Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp Pro Ile Asn Asp Gly Glu  
 85 90 95

Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Ile Gln  
 100 105 110

10 Val Asp Gly Glu Leu Val Ser Gly Arg Ser Pro Gly Pro Asn Val  
 115 120 125

Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ile Gly Gly Ala Pro Asp Val  
 15 130 135 140

Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser Gly Ile Thr Gly Cys Val  
 145 150 155 160

20 Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro Gly Ala Pro Pro Pro Gln  
 165 170 175

Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala Gly Ala Asn Thr Arg Pro  
 180 185 190

25 Cys Pro Ser  
 195

30 <210> 3  
 <211> 508  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 3  
 Arg Thr Cys Arg Cys Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu  
 1 5 10 15

40 Cys Ala Asp Arg Ser Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys  
 20 25 30

Leu Lys Cys Phe Cys Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser  
 35 40 45

45 Trp Ser Arg Ala Gln Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe  
 50 55 60

50 Ser Leu Thr Asn Ala Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe  
 65 70 75 80

Ser Pro Thr Pro Gly Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu  
 85 90 95

55 Ser Gly Pro Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys  
 100 105 110

Val Thr Ser Tyr Gly Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser

	115	120	125
	Gln Pro Gly Ser Thr Pro Leu His Gly Gln Pro Leu Val Val Leu Gln		
	130	135	140
5	Gly Asn Asn Ile Ile Leu Glu His His Val Ala Gln Glu Pro Ser Pro		
	145	150	155
	Gly Gln Pro Ser Thr Phe Ile Val Pro Phe Arg Glu Gln Ala Trp Gln		
10	165	170	175
	Arg Pro Asp Gly Gln Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu		
	180	185	190
15	Ala Gly Ile Asp Thr Leu Leu Ile Arg Ala Ser Tyr Ala Gln Gln Pro		
	195	200	205
	Ala Glu Ser Arg Leu Ser Gly Ile Ser Met Asp Val Ala Val Pro Glu		
	210	215	220
20	Glu Thr Gly Gln Asp Pro Ala Leu Glu Val Glu Gln Cys Ser Cys Pro		
	225	230	235
	Pro Gly Tyr Leu Gly Pro Ser Cys Gln Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Thr		
25	245	250	255
	Arg Thr Pro Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Thr Cys Glu Arg Cys Ser Cys		
	260	265	270
30	His Gly His Ser Glu Ala Cys Glu Pro Glu Thr Gly Ala Cys Gln Gly		
	275	280	285
	Cys Gln His His Thr Glu Gly Pro Arg Cys Glu Gln Cys Gln Pro Gly		
	290	295	300
35	Tyr Tyr Gly Asp Ala Gln Arg Gly Thr Pro Gln Asp Cys Gln Leu Cys		
	305	310	315
	Pro Cys Tyr Gly Asp Pro Ala Ala Gly Gln Ala Ala Leu Thr Cys Phe		
40	325	330	335
	Leu Asp Thr Asp Gly His Pro Thr Cys Asp Ala Cys Ser Pro Gly His		
	340	345	350
45	Ser Gly Arg His Cys Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro		
	355	360	365
	Ser Gln Gly Gln Pro Cys Gln Arg Asp Ser Gln Val Pro Gly Pro Ile		
	370	375	380
50	Gly Cys Asn Cys Asp Pro Gln Gly Ser Val Ser Ser Gln Cys Asp Ala		
	385	390	395
	Ala Gly Gln Cys Gln Cys Lys Ala Gln Val Glu Gly Leu Thr Cys Ser		
55	405	410	415
	His Cys Arg Pro His His Phe His Leu Ser Ala Ser Asn Pro Asp Gly		
	420	425	430

Cys Leu Pro Cys Phe Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser  
 435 440 445

5 Ala Tyr Thr Arg His Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe  
 450 455 460

Gln Gly Phe Ala Leu Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly  
 465 470 475 480

10 Glu Phe Thr Val Glu Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly  
 485 490 495

Asn Phe Ala Gln Leu Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp  
 15 500 505

20 <210> 4  
 <211> 199  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 4  
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
 30 20 25 30

Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
 35 35 40 45

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
 35 50 55 60

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
 40 65 70 75 80

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
 45 85 90 95

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
 50 100 105 110

Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
 55 115 120 125

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
 60 130 135 140

Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
 65 145 150 155 160

Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
 70 165 170 175

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly

180                    185                    190

Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
195

5

<210> 5  
<211> 199  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala  
15        1                5                10                15

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
20        20                25                30

20 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
35        35                40                45

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
25        50                55                60

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
25        65                70                75                80

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
30        85                90                95

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
35        100              105              110

Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
35        115              120              125

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
40        130              135              140

Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
40        145              150              155              160

Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
45        165              170              175

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly  
45        180              185              190

50 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
50        195

55 <210> 6  
<211> 199  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Trp Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 5 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
 20 25 30  
 10 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu/Phe Ser Val Asp  
 50 55 60  
 15 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
 65 70 75 80  
 20 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
 85 90 95  
 25 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
 100 105 110  
 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
 115 120 125  
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
 130 135 140  
 30 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
 145 150 155 160  
 35 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
 165 170 175  
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly  
 180 185 190  
 40 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
 195

45 <210> 7  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 7  
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
 20 25 30  
 55 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
 35 40 45

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
50 55 60

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
5 65 70 75 80

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
85 90 95

10 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
100 105 110

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
115 120 125

15 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
130 135 140

Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
20 145 150 155 160

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly  
165 170 175

25 Arg Ser Glu Arg Asn Leu  
180

30 <210> 8  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 8  
Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
40 20 25 30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
35 40 45

45 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
65 70 75 80

50 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
55 100 105 110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
115 120 125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140

5 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160

Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175

10 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190

Ile  
 15

20 <210> 9  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 9  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30

30 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 35 40 45

35 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 65 70 75 80

40 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110

45 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 115 120 125

50 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160

55 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly

180

185

190

IIIe

5

<210> 10  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 10  
 Leu Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu  
 15 1 5 10 15  
  
 Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val  
 20 20 25 30  
  
 Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn  
 25 35 40 45  
  
 Val Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro  
 30 50 55 60  
  
 Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile  
 35 65 70 75 80  
  
 Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe  
 40 85 90 95  
  
 Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu  
 45 100 105 110  
  
 Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly  
 50 115 120 125  
  
 Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu  
 55 130 135 140  
  
 Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser  
 60 145 150 155 160  
  
 Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys  
 65 165 170 175  
  
 Gly Ile  
  
 50  
  
 <210> 11  
 <211> 200  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 11  
 Arg Ala Gly Pro Pro Phe Pro Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu

	1	5	10	15
	Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Ala Pro Ala Gln Ala His Leu			
	20	25	30	
5	Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu			
	35	40	45	
	Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro			
10	50	55	60	
	Ile Ile Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val Met Gly Ser Thr Ser			
	65	70	75	80
15	Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu			
	85	90	95	
	Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser			
	100	105	110	
20	Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr			
	115	120	125	
	Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His			
25	130	135	140	
	Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val			
	145	150	155	160
30	Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg			
	165	170	175	
	Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys			
	180	185	190	
35	Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile			
	195	200		
	<210> 12			
	<211> 189			
	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
40	<400> 12			
	Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Thr Pro			
	1	5	10	15
45	Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp			
	20	25	30	
	Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr			
	35	40	45	
50	Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val			
	50	55	60	

Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr  
 5 85 90 95

Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp  
 100 105 110

10 Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr  
 115 120 125

Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro  
 130 135 140

15 Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr  
 145 150 155 160

Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg  
 20 165 170 175

Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile  
 180 185

25

<210> 13  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

35 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 40 35 40 45

Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60

45 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 65 70 75 80

Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95

50 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 55 115 120 125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160  
 5 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190  
 10 Ile  
 15  
 <210> 14  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 14  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 25 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30  
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 35 40 45  
 30 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 35 65 70 75 80  
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95  
 40 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110  
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 115 120 125  
 45 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140  
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 50 145 150 155 160  
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 55 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190  
 Ile

5 <210> 15  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 15  
Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

15 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
20 25 30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
35 40 45

20 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
65 70 75 80

25 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
30 100 105 110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
115 120 125

35 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
145 150 155 160

40 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
165 170 175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
45 180 185 190

Ile

50

<210> 16  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu

	1	5	10	15
	Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser			
	20	25	30	
5	Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile			
	35	40	45	
	Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val			
10	50	55	60	
	Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu			
	65	70	75	80
15	Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys			
	85	90	95	
	Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys			
	100	105	110	
20	Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro			
	115	120	125	
	Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr			
25	130	135	140	
	Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro			
	145	150	155	160
30	Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser			
	165	170	175	
	Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly			
	180	185	190	
35	Ile			
40	<210> 17			
	<211> 114			
	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
45	<400> 17			
	Met Thr Cys Lys Met Ser Gln Leu Glu Arg Asn Ile Glu Thr Ile Ile			
	1	5	10	15
50	Asn Thr Phe His Gln Tyr Ser Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu			
	20	25	30	
	Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu Leu Val Arg Lys Asp Leu Gln Asn Phe			
	35	40	45	
55	Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu Lys Val Ile Glu His Ile Met Glu			
	50	55	60	

Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile  
65 70 75 80

Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu  
5 85 90 95

Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly  
100 105 110

10 Thr Pro

15 <210> 18  
<211> 93  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 18  
Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr  
1 5 10 15

His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp  
25 20 25 30

Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys  
35 35 40 45

30 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly  
50 55 60

Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val  
65 70 75 80

35 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu  
85 90

40 <210> 19  
<211> 92  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 19  
Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His  
1 5 10 15

50 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu  
20 25 30

Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile  
35 40 45

55 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn  
50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile  
65 70 75 80

Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
5 85 90

10 <210> 20  
<211> 92  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15 <400> 20  
Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His  
1 5 10 15

Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu  
20 20 25 30

20 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile  
35 40 45

25 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn  
50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile  
65 70 75 80

30 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
85 90

35 <210> 21  
<211> 91  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <400> 21  
Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His Gln  
1 5 10 15

45 Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu Leu  
20 25 30

Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile Lys  
35 40 45

50 Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn Gln  
50 55 60

Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile Ala  
65 70 75 80

55 Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
85 90

5       <210> 22  
      <211> 93  
      <212> PRT  
      <213> Homo sapiens

10      <400> 22  
          Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr  
          1                   5                                   10                           15  
          His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp  
          20   25                                   30  
15      Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys  
          35    40                                   45  
          Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly  
          50   55                                   60  
20      Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val  
          65   70                                   75                                   80  
25      Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu  
          85   90

30      <210> 23  
      <211> 92  
      <212> PRT  
      <213> Homo sapiens

35      <400> 23  
          Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His  
          1                   5                                   10                           15  
          Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu  
          20   25                                   30  
40      Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile  
          35   40                                   45  
          Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn  
          50   55                                   60  
          Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile  
          65   70                                   75                                   80  
50      Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
          85   90

55      <210> 24  
      <211> 85  
      <212> PRT  
      <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile  
 1 5 10 15  
 5 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu  
 20 25 30  
 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile  
 10 35 40 45  
 Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met  
 50 55 60  
 15 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly  
 65 70 75 80  
 Phe Cys Asp Glu Val  
 85  
 20

<210> 25  
 <211> 381  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Pro Thr  
 30 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys  
 20 25 30  
 35 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly  
 50 55 60  
 40 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu  
 45 85 90 95  
 Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys  
 100 105 110  
 50 Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln  
 115 120 125  
 Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys  
 130 135 140  
 55 Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu  
 145 150 155 160

Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu  
 165 170 175  
 Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His  
 180 185 190  
 Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys  
 195 200 205  
 Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys  
 210 215 220  
 Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile  
 245 250 255  
 Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg  
 260 265 270  
 Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro  
 275 280 285  
 Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser  
 290 295 300  
 Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys  
 325 330 335  
 Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg  
 340 345 350  
 Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr  
 355 360 365  
 Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu  
 370 375 380  
 <210> 26  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys  
 20 25 30  
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln  
 35 40 45

Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly  
50 55 60

5 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn  
65 70 75 80

Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu  
10 85 90 95

Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys  
100 105 110

Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln  
15 115 120 125

Asn Gln Thr Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Cys Lys Ser  
130 135 140

20 Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu Pro  
145 150 155 160

Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu Val  
165 170 175

25 Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His Thr  
180 185 190

Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys Trp  
30 195 200 205

Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala  
210 215 220

35 Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu Val Ala  
225 230 235 240

Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu  
245 250 255

40 Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu Val  
260 265 270

Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr Gly  
45 275 280 285

Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val Thr  
290 295 300

50 Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met Leu  
305 310 315 320

Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln Phe  
55 325 330 335

Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly Trp  
340 345 350

	Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met Ser	
	355	360
	Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu	
5	370	375
	<210> 27	
10	<211> 527	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 27	
15	Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala	
	1	5
	10	15
	Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp	
	20	25
	30	
20	Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys	
	35	40
	45	
25	Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp	
	50	55
	60	
	Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn	
	65	70
	75	80
30	Ala Thr Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp	
	85	90
	95	
	Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser	
	100	105
	110	
35	Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro	
	115	120
	125	
40	Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His	
	130	135
	140	
	Leu Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro	
	145	150
	155	160
45	Glu Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro	
	165	170
	175	
	Leu Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys	
	180	185
	190	
50	Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile	
	195	200
	205	
55	Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu	
	210	215
	220	
	His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile	
	225	230
	235	240

	Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met			
	245	250	255	
5	Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly			
	260	265	270	
	Phe Cys Asp Glu Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala			
	275	280	285	
10	Lys Val Ala Ser Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro			
	290	295	300	
15	Ile Lys Lys His Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val			
	305	310	315	320
	Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys			
	325	330	335	
20	Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu			
	340	345	350	
	Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly			
	355	360	365	
25	Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val			
	370	375	380	
30	Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr			
	385	390	395	400
	Val His Val Thr Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys			
	405	410	415	
35	Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys			
	420	425	430	
	Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp			
	435	440	445	
40	Pro Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val			
	450	455	460	
	Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu			
45	465	470	475	480
	Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu			
	485	490	495	
50	Lys Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala			
	500	505	510	
	Ala Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn			
	515	520	525	
55				

<211> 523  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 28  
 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

10 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp  
 20 25 30

Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys  
 35 40 45

15 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp  
 50 55 60

Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn  
 65 70 75 80

20 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp  
 85 90 95

Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser  
 25 100 105 110

Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro  
 115 120 125

30 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His Leu  
 130 135 140

Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro Glu  
 145 150 155 160

35 Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro Leu  
 165 170 175

Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys Asp  
 40 180 185 190

Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile Gln  
 195 200 205

45 Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu His  
 210 215 220

Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile Cys  
 225 230 235 240

50 Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met Met  
 245 250 255

His Met Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe Cys Asp Glu  
 55 260 265 270

Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala Lys Val Ala Ser  
 275 280 285

Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro Ile Lys Lys His  
 290 295 300

5 Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu  
 305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu  
 325 330 335

10 Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu  
 340 345 350

Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu  
 15 355 360 365

Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu  
 370 375 380

20 His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val His Val Thr  
 385 390 395 400

Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Gly  
 405 410 415

25 Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile Leu  
 420 425 430

Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Lys  
 30 435 440 445

Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile  
 450 455 460

35 Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala  
 465 470 475 480

Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys Cys Ile Trp  
 485 490 495

40 Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala Gln Cys Asn  
 500 505 510

Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn  
 45 515 520

<210> 29  
 50 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29  
 55 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Pro Thr  
 1 5 10 15

Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys

	20	25	30
	Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln		
5	35	40	45
	Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly		
	50	55	60
10	Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn		
	65	70	75
	Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu		
	85	90	95
15	Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys		
	100	105	110
	Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln		
	115	120	125
20	Asn Gln Thr Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Gly Leu Cys Lys Ser		
	130	135	140
25	Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu Pro		
	145	150	155
	Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu Val		
	165	170	175
30	Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His Thr		
	180	185	190
	Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys Trp		
	195	200	205
35	Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly		
	210	215	220
40	Ala Leu Ala Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu Val		
	225	230	235
	Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu		
	245	250	255
45	Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg Leu		
	260	265	270
	Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro Thr		
	275	280	285
50	Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser Val		
	290	295	300
55	Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala Met		
	305	310	315
	Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys Gln		
	325	330	335

Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly  
 340 345 350

5 Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met  
 355 360 365

Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu  
 370 375 380

10

<210> 30  
<211> 4124  
15 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 30

atgagagaat gggttctgct catgtccgtg ctgctctgtg gcctggctgg cccccacacac 60  
20 ctgttccagc caaggcttgt gctggacatg gccaagggcc tcttggataaa ctactgcttc 120  
ccggagaacc tgctggcat gcaggaagcc atccagcagg ccataaagag ccatgagatt 180  
ctgagcatct cagaccgcga gacgctggcc agtgtctga cagccgggtt gcagagctcc 240  
ctgaacgatc ctcgccttgtt catctccat gagcccagca ccccccagcc tcccccacaa 300  
gtcccagcac tcaccaggct ctcagaagag gaactgcttg cctggctgca aaggggcctc 360  
25 cgccatgagg ttctggaggg taatgtggc tacctgcggg tggacagcgt cccggggccag 420  
gaggtgctga gcatgatggg ggagtccctg gtggcccaag tggggggaa tctcatggc 480  
acctccgcct tagtgcgtga tctccggcac tgcacaggag gccaggcttc tggcattccc 540  
tacatcatct cctacctgca cccagggAAC accatctgc acgtggacac tatctacaac 600  
30 cgccccctcca acaccaccac ggagatctgg accttgcggg aggttctggg agaaaaggta 660  
ggtgccgaca aggatgtggt ggtcctcacc agcagccaga ccagggcgt ggccgaggac 720  
atcgcgacaca tccttaagca gatgcgcagg gccatctgg tggccgagcg gactggggga 780  
ggggccctgg acctccggaa gctgaggata ggcgagtcg acttcttctt cacggtgccc 840  
gtgtccagggt ccctggggcc ctttgggtgg agcagccaga cgtgggaggg cagcgggggt 900  
ctgcccctgtg tggggactcc ggccgagcag gcccctggaa aagccctggc catcctcact 960  
35 ctgcgcagcg cccttccagg ggtagtcac tgccctccagg aggttctgaa ggactactac 1020  
acgctgggtgg accgtgtgcc caccctgctg cagcaactgg ccagcatgga cttctccacg 1080  
gtgggtctccg aggaagatct ggtcaccatcg ctcaatggcc gcctgcaggc tgcgtctgag 1140  
gatcccaggc tcctgggtcg agccatcggg cccacagaaa cttcccttctg gccccggccc 1200  
gacgctgcag ccgaagactc accagggggtg gcccctggaa aacccctggc catcctcact 1260  
40 cgccaagcac tggtggaact tggttccag gtgtcggtgc tgccaggcaa tggggctac 1320  
ctgcgcctcg atagtttgc tgacgcctcc gtccctgggt tggtggcccc atatgtccctg 1380  
cgccagggtgt gggagccgct acaggacacg gaggacatca tcatggacat ggcacacaac 1440  
cctggaggggc catcctctgc tggccctctg ctccctgtt acttccaggg ccctgaggcc 1500  
ggcccccgtgc accttcac cactatgtat cgccgcacca acatcacgca ggaggacttc 1560  
45 agccacatgg agtcccccggg cccacgctac agccaccaac gtgggggtgtt tctgctcacc 1620  
agccacccgca cccacccggc cggggaggag ttgcgcctcc ttatgcgtc gctgggtgg 1680  
gccacactgg taggtgagat cccgcggggc aacctgtgc acaccgcac ggtgcggctg 1740  
ctggacacac cccgaaggcag cctcgccgtc acctgtccgg tcctcacctt catgcacaat 1800  
caaggcgagg cttggctggg tggtgagtg gtggcccgat ccacatgtct ggccgaggag 1860  
50 gccctggaca aagcccagga agtgcgtggat ttccacaaaa gcctggggcc cttgggtgg 1920  
ggcacagggc acctgctgga ggcccactat gtccggccatg aggtcgtggg gcaagaccgt 1980  
gccttcctgc gggccaagct ggcccaggcc gcctacccgc aagctgtggaa cttggagtt 2040  
ctggcctctc agtcacacgc agacccatcg gaggtgtctg gggaccaccc cttgcgtatgt 2100  
ttccacagcc ctggcgagct ggtggtagag gaagcaccaccc caccaccccc tgctgtcccc 2160  
55 tctccagagg agtcacacta ctttattgtat gcccgttca agacagaggt gctgcccggc 2220  
cagctgggtt acctgcttt tgacgcctat gctgaactgg agacagtgaa ggccgtgggg 2280  
ccacagctgg tgcggctggg atggcaacacg ctggtgccaca cggctgcgt ggtgatcgac 2340  
ctgcgcatac accctggcag ctactccacg gccatccccgc tgctctgtc ctacttctt 2400

5           gaggcagagc cccgccagca cctgtattct gtctttgaca gggccaccc aaaagtcacg 2460  
 gagggtgtga ctttgcggca ggtcgccggc cagcgctacg gtcacaccaa ggacctctac 2520  
 atcctgatga gccacaccag tggctctgcg gcccggccct ttgcacacac catgcaggac 2580  
 ctgcagcggg ccacggcat tggggagccc acggccggag gcgactctc tgtggcatc 2640  
 taccaggtgg gcagcagccc cttatatgc tccatgcca cccagatggc catgagtgcc 2700  
 accacaggca aggcctggga cctggctggt gtggagcccg acatcaactgt gcccattgac 2760  
 gaagccctt ccatagccca ggacatagtg gctctggctg ccaaggtgcc cacgggtgtc 2820  
 cagacggccg ggaagctggt ggctgataac tatgcctctg ccgagctggg ggccaagatg 2880  
 10          gcacccaaac tgagcggtct gcagagccgc tactccagg tgacctcaga agtggcccta 2940  
 gcccagatcc tgggggctga cctgcagatg ctctccggag acccacacct gaaggcagcc 3000  
 catatccctg agaatccca ggaccgcatt cctgaaattt tgcccatgca gatcccttcc 3060  
 cctgaagat ttaaagagct gatcaagttt tccttccaca ctaacgtgt tgaggacaac 3120  
 attggctact tgagggttga catgtttggg gacggtgagc tgctcaccctt ggtctccagg 3180  
 15          ctgctgggtgg agcacatctg gaagaagatc atgcacacgg atgccccatgat catgcacatg 3240  
 agttcaaca tcggtgccc cacatccctcc attcccatct tgcgtccata cttctttgt 3300  
 gaaggccctc cagttctgtt ggacaagatc tacagccggc ctgatgactc tgcgtgtaa 3360  
 ctctggacac acgcccagg ttaggtgaa cgctatggtt ccaagaagag catggtcatt 3420  
 ctgaccagca gtgtgacggc cggcaccggc gaggagttca cctatatcat gaagaggctg 3480  
 gggccggggcc ttgtcattgg ggaggtgacc agtgggggtt gcccggccacc acagacctac 3540  
 20          cacgtggatg acaccaaccc ctacacttact atccccacgg cccgttctgt gggggccctcg 3600  
 gatggcagct cttggaaagg ggtgggggtt acacccatg tgggtgtccc tgcagaagag 3660  
 gctctcgcca gggccaagga gatgtccag cacaaccaggc tgagggtgaa gccggagccca 3720  
 ggccctgcagg accacctgtt gggaaaggggcc ccataggcag agccccaggg cagacagaac 3780  
 ctctgggaca cacaccaagg gcaactctgc aggtggcccg gcctgagggtt cccaggagca 3840  
 25          gcaaaggggc ctgctgagct ctggttaggt tacagctgga ggtgtgtata tatacacaca 3900  
 cacacatgttata tatacacata tataatgttata tgcgttatata tgcgttatata tgcgttatata 3960  
 caataaccac ctaaaatttt acaaagggttc cttctaaatg tgcgttatata tgcgttatata 4020  
 tttaccttcc ttcttcatac ttgtctctt ttcttaata ctcattaatg tgcgttatata tgcgttatata 4080  
 attattttca gatgcagcttca tcattattcc aaaatacaaaa ataa 4124

30

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 579

&lt;212&gt; ADN

35          &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 31

atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytn gnytnytnyt ngcnacncn 60  
 gcncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwstn tywsntggga yaaytgygay 120  
 40          garggnaarg ayccngengt nathmgwnsn ytnacnytn arccngaycc nathgtngtn 180  
 ccnggnaayg tnacnytnws ntngtnggn wsnaclnwsng tnccnytnws nwsnccnytn 240  
 aargtngayy tngtnytna raargargtn gcnngnyntt ggathaarat hcctngyacn 300  
 gaytayathg gnwsntgyac nttygarcay ttytgygayg tnytnyayat gytnathccn 360  
 acnngngarc cntgyccng accntayggny tnccntgyca ytgyccntty 420  
 45          aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygtng tnccngayyt ngarytnccn 480  
 wsntgggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws ngnnaarmgn 540  
 ytnnggntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

50          &lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 633

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

55          &lt;400&gt; 32

tttctttgcg taaccaatac tggaaggcat taaaaggacc tctggccctt cagaccttgc 60  
 agttaactcc gcccgtaccc acccttcccg atgcagtccc tgatgcaggc tcccttcctg 120  
 atcgccctgg gcttgctct cgcgaccctt ggcgcaagcc acctgaaaaa ggtgagtgca 180

ccctttta agagtcgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc gggctcgct 240  
 gagatatggg ggtggccact cggttctca gaattgttac tctgcactag agcctccaa 300  
 agtaactaat tatggattc tggtctgtac aatgagggtg gcctctaaag acttgttctg 360  
 ctccaggccc tttttgaga gattaatctc acgtctgcac tctcctgccc tccctccaag 420  
 cgcggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccaag agattcagtc 480  
 ctgttaaccctgcaccc taccccttat gtccccatg ataaggctg 540  
 ctgcctcatac tcttccctg ctgaaatgcc ctgaggctt cctgagagtt gggagggttt 600  
 gagagcttcaaggccaag aggattcaact aag 633

10 <210> 33  
 <211> 1047  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 33  
 caggagcttgc ccctttgtt gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcaggga 60  
 ggtggaaagt cagagaaggt gcccacaaa ggcctattag gtcagtcctc tgtttggaaag 120  
 ttccaggctt atcatatctt gccttatagt ttacaatataca cttttggag attatgtt 180  
 20 ttgagtttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtttta tcccagggttc 240  
 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctcaccc aaggtcacac 300  
 tgccaggagc tcattttcc tggatctgt gatagtttctt tttgtcaacc tttttcttct 360  
 ttccttcctt tgctgcctga ttgtccccag ccattccacgc tcagtagctt ttccctggat 420  
 aactgtgatg aaggaaagga ccctgcgggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480  
 25 atcgtcgttcc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtggca gcaccagtgt cccctgagt 540  
 ttcctctgtt aggtgagccct ggggggtgggt ggagaagggg aggtgcgagg gtctggccag 600  
 caggggtact ggggcatgtt tgcttggggaa actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660  
 cagagaataag tacaggacat gttagattcag acacttttc acaggttcat ggaatctcag 720  
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgtatgt cagcgcacgc aaccttctgg tgagggcagg 780  
 30 agtgacggat accttgcacc tggcagaagc gtcctggct tctctggcc tggtggccaa 840  
 ctgctcatta ttatctgaca gctctgggtt gccaatttgg ttttgcgttt aattataaaa 900  
 ttgatataacc aattagccag taatatataag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaaa 960  
 taaataaaaat aggccaagtg tgtaacttc atgcctgtaa ttcccacacc cttaggaggc 1020  
 tgaagggtggg tggatcctt tttgagg 1047

35 <210> 34  
 <211> 1706  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 34  
 acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcagaat tgtagagcc aatcaatggg tagtgactac 60  
 ctaaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tccctggctt 120  
 45 tggaaaggatgta aggtgaaaagg attgttttagt gcccagggtt ccagaccacgc ttgggcaaca 180  
 aagtggcccatcttaca aaaaatacaa aattatgttggtggatgttgcctgt 240  
 ctgtttcc cacctacatg ggaggcttagt gcaggaggat cgtctgagcc caggagttt 300  
 agctgcagt gagtgcagtg agccatgtt caaaaaaaaaa aataaaagaa ttctaagtct 360  
 atgtatagtt cagtgttaggg gaaaaatttca catttggat ttaatgtctg ccatgggcac 420  
 50 aataatacac tataactcaca catggccac aatgttgcac ttccttgcac agactatctc 480  
 taagatctca tccagttaaa aattctatgtt taaaatataa ttgcgtcttt ttgaagaca 540  
 gaagagctgg tatgtttgcc ctggaaatttca cacttataac cttttcaaa cttttgtttt 600  
 atttttttt accaggttggaa tttagtttg gagaaggagg tggctggctt ctggatcaag 660  
 atccccatgcac cagactacat tggcagctgtt acctttgaac acttctgttga tttgttgcac 720  
 55 atgttaatttcaacttgggaa gcccctgcac gaggccctgc gtacccatgg gtttgccttgc 780  
 cactgtccct tcaaagaagt aagttacttag ggaggagaga gctgttccccc tttgtggctaaa 840  
 gagatgggggt ttggagagaa gggctttgc atttccttc tgcagatctg catgtctctg 900  
 gatttgcgttgcac ctatcaggaa tcaacttatct tccggagcc tcagttatcc 960

atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020  
 ccatgctcta cagtgcatacg gccgtctctc atcttgcgcg gctgtttga gaatgggaag 1080  
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctt aggagaaaga ccccatcagt 1140  
 5 aggcctccac tgactggcg tccactggct ttcccgcagg gaacctactc actgcccagg 1200  
 agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccacccg gaactaccgc 1260  
 atagagagcg tcctgagcag cagtgggaag cgtctggct gcatcaagat cgctgcctct 1320  
 ctaaaggcga tatagcatgg catcgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaagggtccc 1380  
 ttttcctctg ttttgtt gccaaggcca aactccact ctctgcccccc cttaatccc 1440  
 10 ctttctacag tgagttcaact accctcaactg aaaatcattt tgaccactt acattttagg 1500  
 ctggggcaag cagccctgac ctaaggaga atgagttgga cagtttgc tagcccagg 1560  
 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcg 1620  
 catttccaaa gcagtttaagg aatgggaaca gagtgtttt ggacctgaag aatctttatg 1680  
 actctctctc tttctctttt tttttt 1706

15 <210> 35  
 <211> 633  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 35  
 ttctttgcg taaccaatac tggaaggcat taaaaggacc tctgcgcct cagaccttgc 60  
 agttaactcc gccctgaccc accctcccg atgcagtccc tcatgcaggc tcccttcctg 120  
 atgcgcctgg gcttgcttct cgcgcacccct ggcgaagccc acctgaaaaaa ggtgagtgca 180  
 25 ccctctttta agagtctgtt tgcagccctcc tggcccagct acgggtgtgc gggtctggct 240  
 gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattgggtc tctgactag agccttccaa 300  
 agtaactaat tatgggattc tggctgtac aatgagggtg gctctaaag acttggctg 360  
 ctccaggccc ttttgagata gattaatctc acgtctgcac tctctgc 420  
 30 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccagg agattcagtc 480  
 ctgttaaccc tgcacccctac tctgaccccc cactccttat gtcggccatg ataaggctg 540  
 ctgcctcatac tcttccctg ctgaatgcc ctgaggctt cctgagagtt gggagggttt 600  
 gagagcttcaaggccaaaggaggattcaact aag 633

35 <210> 36  
 <211> 1047  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 36  
 caggagcttgccttgcg gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcaggga 60  
 ggtggaaagt cagagaaggt gcccacccaa ggcctattag gtcagtcctcc ttgtttggaaag 120  
 ttccaggctt atcatatccct gccttatagt ttacaataca cttttggag attatgtctt 180  
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtt tccctgg 240  
 45 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacgggg tgcctcaccc aaggtcacac 300  
 tgccaggagc tcattttcc tttgtatctgt gatagttct tttgtcaacc tttttttttt 360  
 tctcttctt tgctgcctga ttgtccccag ccattccacgc tcagtagctt ttcctggat 420  
 aactgtgatg aaggaaagga ccctgcgggtg atcagaagcc tgactctgg gctgacccc 480  
 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctca gtcgtggca gcaccgtgt cccctgagt 540  
 50 tctctcttgcg aggtgaccc ggggggtggg gggaaagggg aggtgcgagg gtctggccag 600  
 caggggtact ggggcattgtt tgcctggggg actgtgaaga atttcagaat cttggattcc 660  
 cagagaatag tacaggacat gttagattcag aacacttttc acagttcat ggaatctcag 720  
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgtatgt cagcgcacgc aacttccctgg tgagggcagg 780  
 agtgcggat accttgcacc tggcagaagc gtcctggct tctctggcc ttgtggccaa 840  
 55 ctgctcatat ttatctgaca gtcctgggtt gccaatttttgg ttttgttattt aattataaaa 900  
 ttgatataacc aattagccat taatataatgc tcaacttgc aaacacaatg ggtcaaaaaaa 960  
 taaataaaaat aggccaaatgt tggttaacttca atgcctgtaa ttcccacacc ctttaggaggc 1020  
 tgaaggtggg tgggatccctt tttgagg 1047

5       <210> 37  
 <211> 1706  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10      <400> 37  
 acagttagat ccagtcatt tcaatgcaga tgtagagcc aatcaatggg tagtgactac 60  
 ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca ttagtgcata cgccctgtaa tcccagcctt 120  
 tggaaaggta aggtgaaagg attgctttag gcccaggat ccagaccgc ttgggcaaca 180  
 aagttagccc catcttaca aaaaatacaa aatttagctgg gtgtgggtgc atgtgcctgt 240  
 ctgtgtttcc cacctacatg ggaggcttag gcaggaggat cgtctgagcc caggagttg 300  
 aggctgcagt gaggctgactg agccatgata caaaaaaaaaaa aaataaaagaa ttctaagtct 360  
 15      atgtatagtt cagtgtaggg gggaaaaattca catttgatta ttaatgtctg ccatggcac 420  
 aataatacac tataactcaca catgggccac aatgttgcac ttccatagaa acatcttc 480  
 taagatctca tccagttaaa aattctatga taaaatata ttgtgtctt tttgaagaca 540  
 gaagagctgg tatgtttgc ctggaaattta cacttataac cttttcaaa cttttgttt 600  
 atttttttt accaggtgaa tttagtttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660  
 20      atccccatgca cagactacat tggcagctgt acctttgaaac acttctgtga tggcttgac 720  
 atgttaattt ctactgggg agcctgccc gagccctgc gtacctatgg gcttccttgc 780  
 cactgtccct tcaaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttacccc tggctgtaaa 840  
 gagatgggggt ttggagagaa gggctttgc atttccttc tgcagatctg catgtctctg 900  
 gattttaag ccagtggtgac ctatcaggaa tcacttatct tccggggcc tcagttatcc 960  
 25      atctacgaaa tggggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020  
 ccatgctcta cagtgctatg gccgtctctc atcttgcgc gctgtttga gaatgggaag 1080  
 agggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggtctt aggagaaaaga ccccatcagt 1140  
 aggctccac tggactggcg tccactggct ttccggcagg gaaacctactc actgccc 1200  
 30      agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagtgcc tcaccacccg gaaactaccgc 1260  
 atagagagcg tcctgagcag cagtgggaaag cgtctggct gcatcaagat cgctgcctct 1320  
 ctaaaggcca tatagcatgg catctgccc acgagaatgg agcggtgtga ggaagggtccc 1380  
 ttttcctctg ttttgcgtt gccaaggcca aactccact ctctgcccc ctttaatccc 1440  
 ctttctacag tgagttccact accctcaactg aaaatcattt tgtaccactt acattttagg 1500  
 ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgaa cagttctga tagcccaggg 1560  
 35      catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc cctttaacat tctctctaaa gagcctcggt 1620  
 catttccaaa gcagttaaagg aatgggaaca gagggttttta ggacctgaag aatctttatg 1680  
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706

40      <210> 38  
 <211> 1043  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

45      <400> 38  
 tttctttgcg taaccaatac tggaaaggcat ttaaaggacc tctggccct cagacccctgc 60  
 agttaactcc gcccgtaccc acccttcccg atgcagtccc ttagtgcaggg tccccctccgt 120  
 atcgccctgg gcttgcctt cggcaccctt ggcgaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180  
 ctcagtagct tttcctggta taactgtgtat gaaggaaagg accctgcggt gatcagaagc 240  
 50      ctgactctgg agcctgaccc catcgtcggt cctggaaatg tgaccctcag tggctggc 300  
 agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aagggtggatt tagttttggaa gaaggagggtg 360  
 gctggccctt ggtcaagat cccatgcaca gactacatggcagctgtac ctttgaacac 420  
 ttctgtgatg tgcttgacat gttaaattccct actggggagc cctggccaga gcccctgcgt 480  
 acctatgggc ttccctgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcaact gcccaagagc 540  
 55      gaattcgttg tgccgtaccc ggagctgccc agttggctca ccaccggaa ctaccgcata 600  
 gagagcgtcc tgagcagcag tggtggcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgccctctca 660  
 aaggccatata agcatggcat ctggccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720  
 tcctctgttt tggctttgccc aaggccaaac tcccaactctc tgccccctt taatccccctt 780

tctacagtga gtccactacc ctcactgaaa atcattttgt accacttaca ttttaggctg 840  
 gggcaagcag ccctgaccta agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcat 900  
 ctgctggct gaccacgtta ctcatccccg ttaacattct ctctaaagag cctcgttcat 960  
 ttccaaagca gttaaggaaat gggAACAGAG tgTTTtagga cctgaagaat ctttatgact 1020  
 5 ctctctctttt ctctctttt ttt 1043

<210> 39  
 <211> 1047  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 caggagcttg ccctcttgct gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcaggga 60  
 15 ggtggaaagt cagagaaggc gccacccaaa ggcctattag gtcagtctcc tgTTTggaaag 120  
 ttccaggctt atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttggag attatgtctt 180  
 ttgagtctt tagtttagtc ctgcctataaa aatgagtagg ataagtgtta tcccaggttc 240  
 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgcctcaccc aaggtcacac 300  
 tgccaggcgc tcattttcc tggatctgt gatagttct tttgtcaacc tttttttctt 360  
 20 ttccttcct tgctgcctga ttgtccccag ccatcccage tcagtagctt ttcctggat 420  
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcgggt atcagaagcc tgactctggc gcctgacccc 480  
 atcgtcggtc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtggca gcaccagtgt cccctgtagt 540  
 ttcctctga aggtgagcct ggggggtgggt ggagaaggaa aggtgcgagg gtctggccag 600  
 caggggtact ggggcattgtt tgcttggggg actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660  
 25 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acacttttc acagggttcat ggaatctcag 720  
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcggcage aacttccctgg tgagggcagg 780  
 agtgcggat accttgcacc tggcagaagc gtcctggct tctctggcc tggggccaa 840  
 ctgctcatta ttatctgaca gctctgggt gccaatttgg ttttgcgtt aattataaaaa 900  
 ttgatataacc aattagccag taatataatag tcactttaga aaacacaatg ggtcaaaaaaa 960  
 30 taaataaaaat aggccaatgt tggtaacttc atgcctgtaa ttcccacacc ctttaggagc 1020  
 tgaagggtggg tggatctt tttgagg 1047

<210> 40  
 35 <211> 1705  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 40  
 40 acagtagatg ccagtgattt caatgcaagt gtttagagcca atcaatgggt agtgcattacc 60  
 taaagaattt taagactatg gattgagcat gatggctcac ggcctgtaat cccagccctt 120  
 ggaagggtgaa ggtgaaaggaa ttgcttgagg ccaggagttc cagaccagct tggcaaccaa 180  
 agtgagcccc atctctacaa aaaatacAAA attagctggg tgggtggca tggccctgtc 240  
 tggttttccc acctacatgg gaggctgagg caggaggatc gtctgagccc aggagtttga 300  
 45 ggctgcagt agtgcagtga gccatgatac aaaaaaaaaa aataaagaat tctaagtctt 360  
 tgtatagttc agtgcgggg gaaaattcac atttgattat taatgtctgc catgggcaca 420  
 ataatacact atactcacac atgggccaca atgtgcatt tcctagaaca gactatctct 480  
 aagatctcat ccagttaaaa attctatgtat taaaatatat tgctgtttt tggaaagacag 540  
 aagagctggt atgccc tggaaatttac acttataacc ttttcaaac ctttggttta 600  
 50 tttttttta ccagggtggat ttagtttgg agaaggaggt ggctggccctc tggatcaaga 660  
 tcccatgcac agactacatt ggcagctgta ctttgaaca cttctgtat gtgcctgaca 720  
 tggtaattcc tactggggag ccctgcccag agcccctgcg tacctatggg cttccttgcc 780  
 actgtccctt caaagaagta agtacttagg gaggagagag cgtaaccct gtggctaaag 840  
 agatgggggt tggagagaag ggtctttgca ttctccttgc gcaatctgc atgtctctgg 900  
 55 atttgcatac cagtgtgacc tatcaggaat cacttatctt ccggagaccc cagttatcca 960  
 tctacgaaat gggagacttg aacttagatg tgatcttcag ggccctttat ccatataatc 1020  
 catgctctac agtgcstatgg ccgtctctca tcttgcgg ctgtttgag aatggaaaga 1080  
 ggggtggtag ttcatggctg caatccttagc agtggctcta ggagaaagac cccatcagta 1140

ggctcccaact gactggcggt ccactggct tcccgcaggg aacctactca ctgccaaga 1200  
 gCGAATTCTGT TGTGCTGAC CTGGAGCTGC CCAGTGGCT CACCACCGGG AACTACCGCA 1260  
 TAGAGAGCGT CCTGAGCAGC AGTGGGAAGC GTCTGGCTG CATCAAGATC GCTGCCCTC 1320  
 5 TAAAGGGCAT ATAGCATGGC ATCTGCCACA GCAGAAATGGA GCGGTGTGAG GAAGGTCCT 1380  
 TTTCTCTGT TTTGTGTTG CCAAGGCCAA ACTCCCACTC TCTGCCCCC TTAAATCCC 1440  
 TTCTACAGT GAGTCCACTA CCCTCACTGA AAATCATTGTA GTACCACTTA CATTTAGGC 1500  
 TGGGCAAGC AGCCCTGACC TAAGGGAGAA TGAGTGGAC AGTCTTGAT AGCCCAGGGC 1560  
 ATCTGCTGGG CTGACCACGT TACTCATCCC CGTTAACATT CTCTCTAAAG AGCCTCGTC 1620  
 10 ATTCCTAAAG CAGTTAAGGA ATGGGAACAG AGTGTGGAT GARCTGAAGA ATCTTATGA 1680  
 CTCTCTCTCT TTCTCTCTTT TTTT 1705

<210> 41  
 <211> 1043  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 41  
 TTTCTTGCg TAACCAATAc Tggaaggcat ttAAAGGACC TCTGCCGCT cAGACCTTGc 60  
 20 agttAACTCC GCCCTGACCC ACCCTTCCCG ATGCAgTCCC TgatgcAGGC TCCCCTCCTG 120  
 ATGCCCTGG GCTTGTCTC CGCGACCCCT GCGCAAGCCC ACCTGAAAAA GCCATCCAG 180  
 CTCAgTAGCT TTTCCTGGGA TAACTGTGAT GAAGGGAAAGG ACCCTGCGGT GATCAGAAgC 240  
 CTGACTCTGG AGCCTGACCC CATCGTCGTT CCTGGAAATG TGACCCCTAG TGTGTTGGC 300  
 AGCACCAGTG TCCCCCTGAG TTCTCCTCTG AAGGTGGATT TAGTTTGGA GAAGGAGGTG 360  
 25 GCTGGCCTCT GGATCAAGAT CCCATGCAc GACTACATTG GCAgCTGTAC CTTGAACAC 420  
 TTCTGTGATG TGCTTGACAT GTTAATTCCT ACTGGGGAGC CCTGCCAGA GCCCCTGCGT 480  
 ACCTATGGGc TTCCCTGCCA CTGTCCTTC AAAGAAGGAA CCTACTCACT GCCCAAGAGC 540  
 GAATTCTGTT TGCTGACCT GGAGCTGCC AGTGGCTCA CCACCGGGAA CTACCGCATA 600  
 30 GAGAGCCTCC TGAGCAGCAG TggaAGCgt CTGGCTGCA TCAAGATCgC TGCCTCTCTA 660  
 AAGGGCATAT AGCATGGCAT CTGCCACAGO AGAATGGAGC GGTGTGAGGA AGGTCCCTT 720  
 TCCTCTGTT TGTGTTGCC AAGGCCAAAC TCCCACTCTC TGCCCCCTT TAATCCCCCTT 780  
 TCTACAGTGA GTCCACTACC CTCACTGAAA ATCATTTGT ACCACTTACA TTTAGGCTG 840  
 GGGCAAGCAG CCCTGACCTA AGGGAGAATG AGTGGACAG TTCTTGATAG CCCAGGGCAT 900  
 CTGCTGGGCT GACCACGTTA CTCACTCCCCG TTAACATTCT CTCTAAAGAG CCTCGTTCAT 960  
 35 TTCCAAAGCA GTTAAGGAAT GGGAAACAGAG TGTGTTAGGA CCTGAAGAAT CTTTATGACT 1020  
 CTCTCTCTTT CTCTCTTTT TTT 1043

<210> 42  
 40 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 42  
 45 ATGACNTGYA ARATGWSNCA RYTNRMGN AAYATHGARA CNATHATHAA YACNTTYCAY 60  
 CARTAYWSNG TNAARYTNNG NCAYCCNGAY ACNYTNAAYC ARGGNGARTT YAARGARYTN 120  
 GTNMGNAARG AYYTNCARAA YTYYTNAAR AARGARAAYA ARAAYGARAA RGTNATHGAR 180  
 CAYATHATGG ARGAYYTNGA YACNAAYGCN GAYAARCARY TNWSNTTYGA RGARTTYATH 240  
 ATGYTNATGG CNMGNYTNAC NTGGGCNWSN CAYGARAARA TGCAYGARGG NGAYGARGN 300  
 50 CCNGGNCAYC AYCAYAARCC NGGNYTNNGN GARGGNACNC CN 342

<210> 43  
 <211> 4195  
 55 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 43

ttccacctt tggctttgt aaataatgct gctatgaaca tgaatgtaca aacatctgtt 60  
 tgaatccctg cattcaattc tttgcataat atacccagga gcagaatgtat ggatcatatg 120  
 gtaattctgt gtttatttat ttgaggaaca aacttgcgtt ttccataac agctgcacta 180  
 ttacatttc ccactaacag tgatttaggc ttccatattt ctatgcctc accaacactt 240  
 5 gtttctggg tttaaaaga agtagtagtc atcctttagt gtgtcagggt gtatctcatt 300  
 gtcgtttgc ttcatgttt cctaaagatt agtaattttt atatgttatt tgaccatttg 360  
 tatacttct tcggagaagt gtcttattga gtcttcccc aattttgatt gttttgtttt 420  
 tttttgtt tgtagtgta gggattcttt tatattctgg atattaatcc ttatcagat 480  
 atttggttt caaaatttt ctttgaaca acagaaacac accacagtct tcaagggttgg 540  
 10 aagccagttt atctgagtag cattttgtt gttggggga gaggattgtt tcctcctgaa 600  
 atcctgggaa attggccacc tccttcttc ctcttagca tgaagcgcgtt ctggcttctc 660  
 caaagaactc ttcccctcca ctacccatc gttagcttcc tcttccatc cagtgatcct 720  
 ggggtcccg acacaataat taaccaagag agggtgaaag gtcctctgct gtgtttatgc 780  
 aatggcttag gcccctgtga agtgcggagg gaccccaagc agcctccatc tcccagggoa 840  
 15 tggccatcc ccagcttca cagaacagga aagctgttga ggaggtgttgg cagcagggtt 900  
 ggaatggata tagcccttgg caacaacaca ttcccccaca aagcacccac ccaaaagaac 960  
 aacaacgata gttttagttt ttagtaatga gaacaatagt tctcatgact aaaagccatc 1020  
 agccaggaca ctgttctcaa ccctttgcgtt gtcttggac ccttggaaac tctgacagaa 1080  
 gccatggagg aatgttctca ctgagtgcattt gcactcaaaa tgatgcattt aacttcaattt 1140  
 20 cagttcagg gatgtatggc ctgaccacca atgcagggga ttagcaatcg caatagtgg 1200  
 gagggcatgg gagtggaaat ctggctggat caagcaagtg gatgccagca gcccgaaaaa 1260  
 agagcccccc tacctgtttt ttcccttctt ggcactattt cccagcaaat gccttctct 1320  
 ttccgttctt cctacccttcc caccggaaat ttcattctg cacagtgtt gccacattca 1380  
 ctgggttggaa aacagagact gtagcaactc tggcaggag aagctgtctc tgatggctg 1440  
 25 aagctgtggg cagctggca aogctaaccg ctataaaaag gagctgcctc tcagccctgc 1500  
 atgtctcttgc ttagctgtct ttcagaagac ctggtaagtggactgtctg gttttggccc 1560  
 gcactttggg cttctttggg ggagggttgc ggaagtggag cagcttcttctt gagagaggag 1620  
 agagaaagct cagggaggc tggagcaaaat atactcttgg aggtggggag tgaggcagg 1680  
 ataaggaagg agagtatctt ccagcacctt ccagtggttta agggcacattt gtctccatgg 1740  
 30 ctggactttt cttgagcaga ggggtgggtt gtaaggaaag tctacggggcc cccgtgtgtt 1800  
 tgcacatgtc tctgtgtgaa tggacccttc ccctccac acgtgtatcc ctatcatccc 1860  
 acccttccca ccagaggcca tagccatctg ctggtttggat tatttggagat tgcaggccag 1920  
 gacaaggcca tcgctttggg catgaatctt ctgcgtactt ccctggccag atgcaattt 1980  
 cctggcatgg gattcccccag aagttctgtt ttttcagggtt gggcaagttc cgtgggcattc 2040  
 35 atgttgcagg agctggagaa agccttgcac tctatcatcg acgttcttca caagtacttcc 2100  
 ctgataaaagg ggaatttcca tgcgttctac agggatgacc tgaagaaattt gtagagacc 2160  
 gagtgcttcc agtataatcag ggttggggggat ggctgggtt ggcgggggctt ctctgcctgg 2220  
 tccctggggctt gcccggcc aggggttccctc cttccatagatc ctatgcctcg 2280  
 gctctctcttctt agatctttaa actcttggctt ttcctcttcc aatcttgcata gaaaaagggt 2340  
 40 gcagacgtct ggttcaaaaga gttggatatc aacactgtatg gtgcagttaa cttccaggag 2400  
 ttccttcatc tggtgataaa gatggggctg gcagccacca aaaaaagcca tgaagaaagc 2460  
 cacaagagttt agctgagttt ctggggccatc aggctggcc cctggacatg tacatgcaga 2520  
 ataataaaatg catcaatacc tcatgcctt ctctttagtt ttttgaaat gagggttccctc 2580  
 ggtgtggagg gagggttggaa aaccccaaag gaagaaaaaaatcttgcata gaaaaagggt 2640  
 45 tacctcttcac aagcctttcc tggcttaccc ctcacccgtt ctctggccca cattccttca 2700  
 gcccctcatt tcgagcattt gatttggggc ttaaggattt aaaaagtcgtt catgaatata 2760  
 gctgtatgtt ttatgttgc tctggaaatgg gtcggggatt tggggacagg gtggtagtat 2820  
 aagaacaact gatactgtt tctaaatgtt atcttagttt ccagcttccatc gtctttagatg 2880  
 tggctttttt gaaaccttgc tggatagctt catagaatgtt tgggtgtgtt tgggtgtgtt 2940  
 50 tctgtgtgtt tggatgttgc agagagacag acagaaagag agcaagagag ggaagggggg 3000  
 agaggctgtt gttgtgtgtt gttgtgtgtt gttggacaat gttcagatgc ctccattaaac 3060  
 aggataatcc tcacacccatc ccacatcatctt gtagtttgc tttttttt gttttttt 3120  
 ttcctcccttcc tccactccca aactcccaac tcaattaaat gataaaaggaa taggcaaaataa 3180  
 gaaaataaaaat ttagttaaaatc ttaagtcaaa gaataggta ttcatacgctt gcctatggg 3240  
 55 ttctatgtttt tggatgttgc aattttatctt aaaaatctt cccaaagggtt ggtacaagg 3300  
 aggccagaag acgagtttgc tttctcttgc gttggacatc aaaaagaag aaaaatgaagg 3360  
 gaaacctttt gacaagaatg tcaccccaaa ctggattttc atgtgtgtt gttttttt 3420  
 ttctgttgc ttcacttgc tgggtgttgc gttgggtttagt tgggtgttggaaat 3480

agctgtcaca gaatcaactaa accagggttc ttaacttgc tgcatacata tctctgaaat 3540  
 tgggttgaag ttgtgtgcat cattttgagt gacgcaactgaa acattcc ccacggcttc 3600  
 catcgagagt ctcgaaaagg cccaacacct caaaaagggtt aagaacactt gtccgttta 3660  
 ctggtttta gtaacaatgc gcaaggttatt tctctgtc tctctctt tttttttttt 3720  
 5 ttttttttag acacagggtc ttgtgtgca cgtggacttag agtacaatgg gcatgatcat 3780  
 gggctcaact tagcctcgaa cacctgggtt caagtaatcc tcccaccta gcctctttag 3840  
 tagctggac tacagcatga gccactgccc ttggctaatt tttaattat tttttttag 3900  
 agatggaaac ttgctatgtt gcccaggcta gtctcaaaact cctggactca agcgatcctc 3960  
 10 ctaccttgc cttccaaatgt gctgagatta cagtgtgatc cacaccac ac 4020  
 attggagtat ttttattgtt attgttgtc ttgggtgggtt ggtgggtgt tgctttgtgg 4080  
 ggacgtgtgt tggtgccaag ggctaaatca gttcctaccc tgctgcccac agtcctccac 4140  
 agcttcctg ctctgtgaag ctaaggatac accccgatga taagctgtca acata 4195

15 <210> 44  
 <211> 477  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 44  
 tttttttttt ttttttttgg ataaagactt atttatttatt tatcttatca tttcccaagaa 60  
 caaaggccat ttagtaagcc attcccttta aacttgggtt ggcagctgtc acatggctga 120  
 cctcttaatt acttccaca gccttgcata tgactgtggc catgcccacg tgggttggtc 180  
 tcatgcagct tctcatgaca ggcaaagata aacttgcata tcagcatcat acactcctca 240  
 25 aagctcgatc gattgtcctg gttgtgtcc aggtcctcca tgatgtcatt tatgagggtt 300  
 tcatttctct tctcttctt cataaaaggt tgccaaactg tgcttccac catttggct 360  
 gaattccctt ttgctcagggt tgtagggng ggtcttccctt cttaaagatg tgatgaaagg 420  
 gggccagatg ggggggttat gctgcgttcc atctgaaaag tggctttgtt gggccat 477

30 <210> 45  
 <211> 406  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 45  
 tttttttttt ttttggagga agagacttta tttggccca gcccctagcc 60  
 ccacagccaa gacagtttga cataacaggc cccggggccc tgggtggta gaggcagggt 120  
 ggcctggccct cctgatttgc ggctgtggcc tggccacca tgactgtggc cgtggccggg 180  
 40 gcaactgtga tcttgccac tgggtctta ggggggtccc tccccgggc ctggctttag 240  
 gtgggtggccca gggccctcgat caccctcgat catttttcg tggggggccc aggttagct 300  
 cgccatcagc atgatgaaact cctggagctc agctgcttgc ctgcatttgg gtcagggtcc 360  
 tccatgatgt gttctatgac ctttcatttctt tatttctctt tcttga 406

45 <210> 46  
 <211> 425  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 46  
 ggaggaagag actttatgg gccccagccc ctatccccac agccaagaca gtttgacata 60  
 acaggccccg gggccctggt tggtaaagg cagggtggcc tggctcctt attagtggct 120  
 gtggccgtgg ccaccatgac tggccctggt ggcgtggca ctgtatctt ggccactgtg 180  
 55 gtcttagggg gtggccctcc cggggctgg cttatgggtt tggccaggcc cctcgatcacc 240  
 ctgcgtgatc ttctcgatgg agggccagggt tagcctcgatc atcagcatga tgaactcctc 300  
 gaagctcagc tgcttgcata catttgcata cagggtccac atgatgtgtt ctatgaccctt 360  
 ttcatttctt ttctcatttctt tgagaaaatt ttgcagatct tttcgacca gctcttngaa 420

425

ttccc

5                   <210> 47  
 <211> 565  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10                  <400> 47  
 aattcgctcg gctttgacag agtgcacagc gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaaacg 60  
 caacatagag accatcatca acaccccca ccaatactt gtgaagctgg ggcacccaga 120  
 caccctgaac caggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180  
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240  
 agacaagcag ctgagctcg aggagttcat catgctgtat gcgaggctaa cctgggcctc 300  
 15                  ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcg 360  
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420  
 tcatggtggc cacggccaca ggcactaat caggaggcca ggccaccctg cctctaccca 480  
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttgct gtggggctag gggctgggc 540  
 20                  565  
 caaataaagt ctcttcctcc aaget

25                  <210> 48  
 <211> 430  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30                  <400> 48  
 gacttggagg aagagacttt atttggccccc agccccctagc cccacagccca agacagttt 60  
 acataacagg ccccccggggcc ctgggtgggt agagggcaggg tggcctggcc tcctgattag 120  
 tggctgtggc cgtggccacc atgactgtgg cctgtggccgt ggccactgtg atcttggcca 180  
 ctgtggtctt aggggggtgcc ctcccccggagg cctggcttat ggtgggtggcc agggccctcg 240  
 tcaccctctgt gcatcttcgc ttggggaggcc caggttagcc tcgcctatcag catgtgaac 300  
 35                  tcctcagaagc tcagctgttt gtctgcattt gtgtccaggt cctccatgtat gtgttctatg 360  
 accttttcat tcttatttcgc ctcttggaga aaattttgca gatctttcg caccagctct 420  
 ttgaattccc 430

40                  <210> 49  
 <211> 305  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

45                  <400> 49  
 tgacttggag gaaaaaaaaactt tatttggccc cagccccctag ccccacagcc aaaacagttt 60  
 gacataacag gcccccccccc cctgggtggg tagaggcagg gggccctggc ctcctgatta 120  
 gtggctgtgg cccggggccac catgactgtg gccggggcccg gggccactgt gatcttgcca 180  
 ctggggtctt aggggggtgcc ctcccccggagg cctggtttat ggtgggtggcc agggcccttg 240  
 tcacccttgtt gcatttttc gtggggaggcc caggttagcc tcgcctatcag catgtgaac 300  
 tcctc 305

50                  <210> 50  
 <211> 452  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

55                  <400> 50  
 ggaggaagag actttatgg gccccagccc ctggccac agccaagaca gtttgacata 60

acaggccccg gggccctgg tggtagagg cagggtgcc tggcctctg attagtggct 120  
 gtggccgtgg ccaccatgac tggccgtg gccgtgcc ctgtgatctt ggccactgtg 180  
 gtcttagggg ggcctccc cgaggcctgg cttatgggg tggccaggc cctcgtaacc 240  
 ctcgtgcatt ttctcggtgg agggccaggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcc 300  
 5 gaagctcagc tgcttgcctg catttgtgtc caggccctcc atgatgtgtt ctatgaccc 360  
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct ttgcacca gctcttgaa 420  
 ttccccctgg ttcaagggtgt ctgggtgccc ca 452

10 <210> 51  
 <211> 4439  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51  
 atcaactgtgg agtagggaa gggcactcct ggggtggcaa ggtgggaggt gggccctgtg 60  
 ttcccacagt gggcagggag gtatgtaaag ggaagctggc cggacaggaa gggccattcc 120  
 aagaggggctt tgcgcagg gctaagccaa gcttctcca taggcaatgg ggagcaactg 180  
 gaggttcgtt gcaaggagaag gacacatcaa gcccaccagg aggctaagta aaaacagtt 240  
 20 tctcccaagt tataagttcc tggAACCTT gctggagca ggatTTtagaa aaatgtatgt 300  
 gagagatgtc agaaacatat tcggccctgag gctctctcac tcagactgca agaggaaggt 360  
 atcatcagaa ttgccttaa ccaggaacca gaatagctgg gtccccttcc tgccaagtc 420  
 gcaaccagct atgtgaccc tgcagggtcc atctccgggt gtcagttct tcatctacaa 480  
 tgcaagaggg ttgcccaccc ctgagaaccc ttctaacccc aaatctcacc ctatgaatct 540  
 25 aagaacacaa cccctcgcca tcctaagtat cacagagcc ggcaggatcg ggtgagagct 600  
 cagaccatcc ttgtggact aaaaggaagg ggcagactgc catggggggc agccgagagg 660  
 gtcaggcccc cataggctt cagcctgtt caacctaaaa ggggatgggg ggctgagttg 720  
 tgccagagga gcagcaggct cgtcggggg gtagtaggccc tttagataga agggaaatga 780  
 actaaacaac cagcttcctg caaaccagtt tcaggccagg gctggaaatt tcacaaaaaa 840  
 30 gcagaaggcg ctctgtgaac atttcctgcc cgcggccagc ccccttcctg gcagcattag 900  
 cacactgctc acctgtgaag caatcttcgg gagacaggc caaaggccaa gtgccccagt 960  
 caggagctgc ctataaatgc cgagcctgca cagctctggc aaacactctg tggggctct 1020  
 cggctttgtt aagtggactc ccagcttccc caggcagaag cctgctgccc gatccctt 1080  
 ttcttccttcc gacccaaactt cttccaaat cttccctcta gaagccctcc ttgggtggcc 1140  
 35 ctgcctactt taaagcttct ttacatTTT ctaggtcat gttcccttgg ggccctctgc 1200  
 cctcaaatgc ttgtgtttt ggcaactctgt agatattcta aaaaatcatt ttgtacatgt 1260  
 gtgtgacagg ccacatccccca gtaagttgc agcctgtgt ttctttttat ttgcacttc 1320  
 ccccaactatt tctgtgatgt ctttagtaga agtgcataag aagcttgcata gatTTCTT 1380  
 ctaagtgtcc caactttggg ttcccattt cacagacaga gtgcaggacg atgacttgc 1440  
 40 aaatgtgcga gtcggaaacg aacatagttt ccatcatcaa caccctccac caataactctg 1500  
 tgaagctgg gcacccagac accctgaacc agggggaaat caaagagctg gtgcggaaaag 1560  
 atctgcaaaa ttttctcaag gtggggctgg actctggcag gtctgacccca gcctcaccgc 1620  
 agttgggtt gacaaggagg gatggggatg tgggtacacg caatcaaggg gaagatttga 1680  
 gtcctggag cccagccccca agacgcagcg agtgcctgt tatacaggcc aggtgctcac 1740  
 45 agttacacag gacgacaggc tcaagaaaatt gctcaattga acacctgtca ttgtcgggc 1800  
 cctgttctgg gcagaggat gtatgtgtt atggggaccc actatccat gaggagacac 1860  
 acagtaaatg ttttgccttcaaa taaagagcac agataaaagcc aaatgccaat aagtgcctgg 1920  
 aagaaaaatgt gatagagtgc gctgtggggca atggggctgg gtgggtggaa ggtgaccagt 1980  
 tagggtacat gagaaggccc tcttgagga ggtacatTTT gagctgagcc ccaaatgttt 2040  
 50 gggagggaaag cccctgagga tgacacttgg cacaaggctg aggagaccct aagcctcagg 2100  
 gcaacttgg ggtggaaagac ttggggggctt ttcttaatctt aagggtctgc ggtggaaaat 2160  
 gaatgcataa agagcacatg gagagcacct gcacagcact cagggaaactg ggaggTTTT 2220  
 ccccccgttcc aaaaatgatt aggcaatgtt aagaaaaagg ctgagcactt ccaacagcc 2280  
 ttttgggtttc ttttcaattt tggggaaaagt cggggaaacag aggctgtcat taagaagggt 2340  
 55 ggaacacatcg ggtctcagtc tcagttccag tcccgagcc agacatctg ggttaggtcc 2400  
 ccagccctcc cagtgcctt ccctccgcct tggtaagggt gagaattgca gccttcagag 2460  
 tttagggcccc tgacagcttccatagggtgg aggctcagg caggcaggat gtcgggtggg 2520  
 gtaggcaaga aaggccccag cagagaggcc gcatcgaaaa actatccctcc atgtgacccc 2580

ctatgcccgc ttcacccccc acctgacatc ccccaccaga agcaaagcga tgctgtggga 2640  
 aaggaagcag agcctcatgg atgggctgca caggagagt ctcgcattgg ctgggtaccc 2700  
 cacaggttct gggagggac tttagcgaggt gactcagtgc ctggcctcc caaagtgctg 2760  
 ggattacaag catgagccac cctgtccgac catctccctt ttatacttt atcacacccct 2820  
 5 tgaggtcagc ggagcacata ctctgctctc tgaccctcca tctccctgc ccacacccat 2880  
 gttttctag tgtttccccg ttgtatttgt tgaaataagt ttcaactatt gtaacacctcc 2940  
 agagggaaagg gaagggaggg caggggaagg agtgaagtgc agagggtag cagagtggaa 3000  
 ctggcctcta agtcagatct gaatttgcat gccctcaata gtcaagcctg taaaaactaa 3060  
 10 tgaccctctc taggacttgt t' -aagtctt cttccaggaa gataccattc cttagctgtta 3120  
 aagttgttat aaggacccaa tgaggtgaca tttccagget tactcatgcc atgaccagg 3180  
 caagaccctg gaactcatgt tcctcttcta taaatagaga atcagacccc aagtacacagg 3240  
 gtcatggagg gaataaaactg gagagcgtt ggtatgtgtc cagtgtctgc tccattgtgc 3300  
 15 gcactcagcc tatggtcatt tttaattttt aaatccagcc ccagggtcga ggcttccttg 3360  
 tacatttgcg agctggcatt ttactgtgtc cccagtcctt acctctggcc acacccagct 3420  
 ctcacagcct tctctccca cccgcagaag gagaataaga ataaaaaggat cataqaacac 3480  
 atcatggagg acctggacac aaatgcagac aagcagctg gcttcgagga gttcatcatg 3540  
 ctgatggcga ggctaacctg ggcctccac gagaagatgc acgagggtga cgagggccct 3600  
 ggcaccaccataaagccagg cctcggggag ggcacccctt aagaccacag tggccaagat 3660  
 cacagtggcc acggccacgg ccacagtcat ggtggccacg gccacaggcc actaatcagg 3720  
 20 aggccaggcc accctgcctc tacccaacca gggccccggg gctgttatgt caaactgtct 3780  
 tgctgtggg gctagggct ggggcaaaa agtctcttcc tccaagtcag tgctctgtgt 3840  
 gcttcttcca cctcttcac aaccctgcct tcccagggtt ctggcattta gacagccctg 3900  
 tccttatctg tgactcagcc ccctcattca gtattaacaa aatgagaagc agaaaaacat 3960  
 gggctgtgc tggggccctt ggctcacetc cctgaccatg tcctcacetc tgacttcagg 4020  
 25 ccccactgtt cagatcccag gctccctgcc ccatacaga caccctgtcc agcctgtcca 4080  
 gcctgacaaa tggcccttgt cactgtacac tgttagaaagc aaaaaggcat atctctaccc 4140  
 ctgtatatgc ctgctaccc accaaccaggcccacccctg tcttcaccca tcaactgtct 4200  
 cacagccctc tctctctctt aacagaattt tattcctctg aaagtcttca gaaactggac 4260  
 30 cttagatagtccatgtcgg ggaggaatat ggcaccaggc agtggaaaaca aggacagatc 4320  
 ggtgtgttat ctcacatttgc atcagagac atgatctctc ttaacagacc tgccaccctt 4380  
 atcaacggga gtgctcacac aagtgggagt ctgagagctt agccctatgc ccaccctgg 4439

35 <210> 52  
 <211> 565  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 52  
 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaaacg 60  
 caacatagag accatcatca acaccccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120  
 caccctgaac cagggggaaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctcaaa attttctcaa 180  
 gaaggagaat aagaatgaaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaaatgc 240  
 agacaagcag ctgagctcg aggagttcat catgctgatg gcgaggtaa cctggccctc 300  
 45 ccaacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360  
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggcacggcc atggccacag 420  
 tcatggtggc cacggccaca ggcactaat caggaggcca ggcacccctg cctctaccca 480  
 accaggggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgcgtttgtt gtggggctag gggctggggc 540  
 caaataaaagt ctcttcctcc aagct 565

50

<210> 53  
 <211> 255  
 <212> ADN  
 55 <213> Homo sapiens

<400> 53  
 gayaayggng aygtntgyca rgaytgyath caratggtna cngayathca racngcngtn 60

mgnacnaayw snacnftygt ncargcnytn gtngarcayg tnaargarga rtgygaymgn 120  
ytnggnccng gnatggcnga yathtgyaar aaytayathw sncartayws ngarathgcn 180  
athcaratga tgatgcayat gcargaycar carccnaarg arathtgygc nytngtnggn 240  
ttytgygag y argtn 255

3

<210> 54  
 <211> 2724  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 54  
 cgcgctatgt acgccccttt cctcctggcc agcctcctgg ggcggctct agccggcccc 60  
 gtcccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtgt ggtgccagaa tgtgaagac 120  
 15 gcttcgcact gcggggcagt gaagcaactgc ctgcagaccc tttggaaacaa gccaacagt 180  
 aaatcccttc cctgcgcacat atgcaaagac gttgtcaccc cagctggta tatgctgaag 240  
 gacaatgcca ctgaggagga gatccttggta tacttggaga agacctgtga ctggcttccg 300  
 aaaccgaaca tgtctgcctc atgcaaggag atagtgact cctacccc tgcataccctg 360  
 20 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggaggtgt gctctgcct caacctctgc 420  
 gagtcctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480  
 atccccagagc tggacatgac tgaggtggta gcccccttca tggcaacat ccctctccctc 540  
 ctctaccctc aggacggccc cccgaccaag ccccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600  
 caggactgca ttcatgtgt gactgacatc cagactgcgt tacggaccaa ctccacccctt 660  
 gtccaggcct tggtggaca tgcataaggag gactgtgacc gcctggggcc tggcatggcc 720  
 25 gacatatgca agaactatat cagccagttat tctgaaaattt ctatccagat gatgatgcac 780  
 atgcaaccca aggagatctg tgcgttgggtt gggttctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840  
 atgcagactc tggtccccccg caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaaactg 900  
 gtggagccca ttaagaagca cgaggtccca gcaaagtctg atgtttactg tgaggtgtgt 960  
 30 gaattcttgg tgaaggaggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaaagaaaa 1020  
 ctcgcacgtt ttgcacaaaat gtgcgtcaag ctggcgaagt ccctgtcgga agagtggcc 1080  
 gaggttgggg acacgtacgg cagtccttccctt tgcgttgggg ggtcagccct 1140  
 gagctgggtt gcagcatgt gcacccctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200  
 35 cacgtgactc agccaaaggaa cggtggcttc tgcgttgggg gcaagaagctt ggtgggttat 1260  
 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tgcgttgc tttttagaaaa 1320  
 ggcgtcagct tcctggccaa cccttaccatc aagcgttgc atcaggatgtt ggcagagttac 1380  
 gagcccggtgc tgatcgagat cctgggtggg gtatggatc ctgcgttgcgtt gtcgttggaa 1440  
 40 attggagccct gccccctggc ccataagccc ttgttggggaa ctgagaagttt tataatggggc 1500  
 ccaagctact ggtggccagaa cacagagaca gcagcccaat gcaatgttgc cgagcattgc 1560  
 aaacgcctatg tggatggacta ggaggaggaa tattccatc tggcagaaac cacagatgg 1620  
 gttttttctt acttgtgtgt ctggggaaat gaacgcacag atctgtttga ctgggttata 1680  
 aaaatagggc tccccccaccc ccccccatttc tgcgttgcattt attgttagcat tgcgttgc 1740  
 aaggggagccc ttagccccctg gcagacatag ctgcgttgcgtt gcccccttgc tgcgttgc 1800  
 atggatgttg atgcacttggaa ggttttttag cctggcccttgc catggcgctt gtcgttgggg 1860  
 45 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt ttttgcgttgg aggccatcaa cccttgcgtt 1920  
 tgaggccctg ttctgagccct tgacatgtgc ttggcactg gtggccctgg gtcgttgggg 1980  
 tggccctctg ccctgatcatgg gacccctccctt cgcgttgcgtt ggcctctcgtt tggatggggaa 2040  
 gcaagaaaaac aaaggcgttgc ttatatggaaa gattagaagc ctggaaataat caggcttttt 2100  
 aaatgatgtt atccccactg taatagcata gggatgggg aagcgttgc tggatggccgtt 2160  
 ggacatcagt gggggccaaagg gttctctgtc ctgggttcaat ctgtgtttttt gtcgttccgtt 2220  
 50 gtcttcctg gtatggccctt gttttgggtt ctgtgggtt ggggtggaaag aggcccccattc 2280  
 tgcctgaatg taacctgtca gcttcggaa gcccctgcggg cctggccctgtt gtcgttgggtt 2340  
 ggacagttgtt ggccgcgttgc tgcgttgcgtt gttgttgcgtt atgtccctgg ctggatggc 2400  
 gtcgttgcgtt cctgcacccccc tcccttgcgtt tcatagatgc tgcgttgcgtt gtcgttgggg 2460  
 55 aaatatggat ggcaagctcc taggcctctg ctgggttcaat gggggccggca tggccgaagg 2520  
 tctgttgggtt gtggatggaa tgctgggtt ggggggttgg aagcgttgcgtt tggcccaactt 2580  
 gggccacccac gttctgtcc acttctgggtt gcccggggccatc agcaagccaa gcccggccatc 2640  
 catgaagttt ctatataattt gacttcgttca tttttgtttt gcaactaaat ttctgttgcatt 2700  
 taacaataaa attctgtttag ccag 2724

5 <210> 55  
 <211> 2171  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 55  
 cgcgctatgt acgccccttt cctcc' ggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccc 60  
 gtccttggac taaaagaatg caccaggggc tcggcagtgt ggtgcacaa tgtgaagacg 120  
 gcttcgact gggggcact gaagcactgc ctgcagacgg tttggaaacaa gccaacagtg 180  
 aaatcccttc cctgcgacat atgaaagac gttgtcaccc cagctggta tatgctgaag 240  
 gacaatggca ctgaggagga gatcccttgt tacttggaga agacctgtgatctggcttc 300  
 aaacccaaca tgtctgttc atgcaaggag atagtgact cctacctccc tgcatacctg 360  
 15 gacatcatta aaggagaaat gaggcgtctt ggggaggtgt gctctgtctt caacctctgc 420  
 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgaa gtccaataag 480  
 atccccagacg tggacatgac tgaggtgggt gcccccttca tggccaaacat ccctcttc 540  
 ctctacccttc aggacggccc cccgagcaag ccccaagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600  
 caggactgca ttcatgtgt gactgacatc cagactgtg tacggaccaa ctccacctt 660  
 20 gtcaggcct tggtaaaca tgcataaggag gagtgtgacc gcctggggccc tggcatggcc 720  
 gacatatgca agaactat cagccagtt tctgaaattt ctatccagat gatgatgcac 780  
 atgcaacccca aggagatctg tgcgtgggtt gggttctgtg atgaggtgaa agagatgcc 840  
 atgcagactc tggccccccg caaagtggcc tccaagaatg tcataccctgc cctggaaactg 900  
 gtggagccca ttaagaagca cgaggcttca gcaaagtctg atgtttactg tgaggtgtgt 960  
 25 gaattcctgg tgaaggaggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaaata 1020  
 ctgcacgctt ttgacaaaat gtgtcgaag ctgcgaagt ccctgtcgga agagtgcac 1080  
 gaggtgggtt acacgtacgg cagtcctatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcggccct 1140  
 gagctgggtgt gtagcatgtgc gacaccttgc tctggcaccc ggtgcctgc actgaccgtt 1200  
 cacgtgactc agccaaagga cgggtggctt cgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260  
 30 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320  
 ggctgcagct tcctgcaga cccttaccatc aagcagtgtg atcagtttgc ggcagagtt 1380  
 gagccctgtc tgatcgatc cctgggtggag gtatggatc ctgcgttgc tgctggagaa 1440  
 attggagcc tccccctcgcc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatgggc 1500  
 ccaagctact ggtccagaa cacagagaca gcaagcccttgc gcaatgtgtt ggcattgc 1560  
 35 aaacggccatg tggtaacta ggaggaggaa tattccatc tggcagaaac cacagcatttgc 1620  
 gttttttctt acttgggtgt ctgggggaaat gaaacgcacatc atctgtttgc ctgggttata 1680  
 aaaataggcc tccccccatc ccccccatttc tgggtttttt attgtatgc tgctgtctgc 1740  
 aaggggccctt ctageccctg gcaagatgtgc tgcgttgc gcccccttgc tctctgttag 1800  
 atggatgtt atgcactggat ggttttttgc cttggcccttgc catggcccttgc gttggaggag 1860  
 40 gagagagctc tgctggcatg agccacatgtt tcttgactgg aggcacatcaa ccctttgggt 1920  
 tgaggccttgc ttctgagccctt tgacatgtgc ttggggactg gtggcctgg gcttctgagg 1980  
 tggcctcctg ccctgtatcgg gggccctccc cgcttgccttgc ggcctctcgg ttgaacccaa 2040  
 gcaaaaaaac aaaggcactt ttatatgaaa gattagaagc ctggaaataat caggcttttt 2100  
 aaatgtatgtt atccccactg taatagcata gggatttgg aagcagctgc tgggtggcttgc 2160  
 45 ggacatcagt g 2171

50 <210> 56  
 <211> 35465  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 56  
 gatcttggct cactgcaacc tccgcctcca aggttcaagc gatccctccc cctcagcctc 60  
 ccaagtagct gggattacaa gctgtgtcta tcacacctgg ctaattttttta tattttttgg 120  
 agagatgggg tttcaccttgc ttgggttaggc tgggtttggaa ctccctgacatc caggtgatct 180  
 ccctgcctca gcctccaaa gtgctggat tacaggtgtg agccacccgcg cccagcctga 240  
 cccttttttgc ctctactggc aaaactcctg ctccctttta aagccaagct catgtcacct 300

	cctctgtgaa	gtcctcgctg	actccccaag	cggtcagtgt	ctctctcgta	tgggctcccc	360
	ggcccccgtca	ctgctctcca	tcacaccctg	accactctgg	gcagtggccc	ccctccccac	420
	ccactgacta	tgggctcctt	gaaggcaggg	cctgggtctg	ccccatctt	gtgtccccag	480
	caatgctggg	catgagtcag	cctcagaaga	catctgctga	atggctgaa	accagaggaa	540
5	atatctccag	cctcaggctg	ggacccctcc	cctctctctt	cccacctctg	acttcatacc	600
	actcacccctc	cagagtcttc	aatggccact	attacttca	acagttggcc	tgtgacaggg	660
	aatcagggtca	tcttccacgg	ctaccagggt	tttcatgtct	actgtgactt	ccaggaccac	720
	aagccctttt	gcccaccca	tgtttcacc	taagagatct	tcaaagccca	gtatgtctct	780
10	ggcacccagt	ggatcctcca	tgcccactgc	ggatcccaag	cctctgcct	ccttgaagtc	840
	caccaaata	gcaacaccca	acagatcctt	agtgcccacc	aaaccagcga	catcccgtaa	900
	ctcagtcatg	agcccaagca	gttccaagtc	caccaaatacg	accagtacaa	aaagagcccc	960
	ttcttaaccgg	cccagcagca	ggtcccggagt	ccgcagcaaa	gcaagaacac	ccagcagggt	1020
	gagcaccgac	accaggacca	gcaaagccag	caaggccagc	gacgtgagat	gccaccagcg	1080
	gaggggcaca	cacagccggg	gttaggacacc	tggcagaagg	ggaagccgca	getccaagag	1140
15	gtcaccacgc	agggccagca	ctcttgcag	gataagaact	catggtgc	gaccaggcat	1200
	ggccagcagg	gtgagaactc	ccacttcaca	gcaaaaagg	agccgggaa	agagttacgg	1260
	coggcctaga	accagcaaca	gggaaaggag	tgacagccag	cctagaaatc	tgagcaagaa	1320
	gagttaccgc	ccaccaggag	gctcaggtat	agggaggagt	tccgagctgg	ctgttaactcc	1380
20	cagtacagcc	aagtgtcaaa	ccccactgg	aattccctcc	aaggagaaga	gtgacaaccc	1440
	atctccatcc	tcatcaagga	aggtgaagag	ctacggctag	atgatcatcc	ccagtaggg	1500
	aaagagttac	agccccactg	aaatgtccag	cagggtaag	agttataacc	aggccagcac	1560
	ccgcagcagg	ccgaaatgc	acagccaatc	tagaagcc	agaaggtaa	gaagtggcag	1620
	tcagaagagg	acgcacagca	gagtgagaag	tcacagttgg	aagagaacc	atagcaggc	1680
25	aagaagtgc	acccggaagg	gaattctgag	ccagatgg	agacacagcc	agtctagaag	1740
	ccacagcaag	ggggaaagtc	aaaaccaatc	tagaacc	agaagaggaa	gaagtcaaca	1800
	ctggctctaga	aaccccagca	aggaaaagaag	tcatagccat	tccagaagct	ccagcaaaaga	1860
	gagagatcac	aggggatcta	gcagccccag	gaaggagagt	ggtcgacgtc	aatcaggaa	1920
	ccccacaac	cagagagatc	acagccgatc	tagaagtccc	aacaaggcga	gagatcgcag	1980
30	ccgatctaga	agtcctaca	aggcgagaga	tcgcagccg	tctagaagtc	ccaaacaaggc	2040
	gagagattgc	agccgatcta	gaagttccct	caaggcga	gatcgcagcc	gatctagaag	2100
	tcccaacaag	gcaagagatc	atagccgatc	tagaagtccc	aacaaggcga	gagatcgcag	2160
	ccgatctaga	agccccagca	aggaaaagaga	tcacagccaa	cttggaa	ccagcaaaaga	2220
	gagagatcac	agacgatcta	gaagccccag	caaggagaga	cagtgcagac	aatctagaag	2280
35	ctccagcaaa	gagagatc	acagacgatc	tagaagcc	tcgcagcc	tcagaagcc	2340
	acaatctaga	agccccaa	aggagagaga	tcgcagccaa	tctagaagcc	ccagcgagga	2400
	gagagagcac	agacaatcc	gaagccccag	caaagagaga	gatcgcagac	gatggagaag	2460
	ccccagcaag	gagagagagc	gcagacaatc	tagaagctcc	agcggaggaga	gatgcacac	2520
	ccgatctaga	agccccaa	agcagatgg	ttacagtctg	cctagagcc	ccagcaagg	2580
40	gaaagctcat	agccgatcta	gaaccccccag	caaagaaga	aatcatagcc	aatctagaac	2640
	ctctagcaag	gagagcgacc	ccagtcata	tacagtcccc	agaagtc	actggaaag	2700
	atccccctact	aggacaagca	gtctcagtca	gaatagaacc	cctagcaaga	caagcagcc	2760
	ctccccatca	acatttccca	gtgggggcca	aacccta	caggatgaca	gtcaagcc	2820
	cgccaccacc	tctaaaggca	ccttacctgg	ggaaagg	tcatcatctt	cttccaagct	2880
45	ggcgtagccc	ccagtctcag	ctggctcag	ggtctctgtc	atgaccggg	gaggggacag	2940
	gagacaggag	cagagcagca	gctgagcag	gtccctcccc	ggccagctc	ccacagcc	3000
	acctccggcc	acaagttctc	taatacagga	tgttggcagg	tagagagg	tgttggatag	3060
	ggggaaaggaa	aagacctgt	atgattcaat	aaattttac	atagcacc	tcccccacaa	3120
	gccaactgt	gtgctactg	ctggcatggg	gcacagagga	ccccagctc	gtccctgact	3180
	gtctacaggg	tcttgactgc	aaggccctg	cctctctagg	tctttttt	tttgagaca	3240
50	gagtctctc	ctgttgc	ggctggagtg	cagtgggt	atctcagtc	actgcacac	3300
	ccacctccca	ggctcaagca	atttcctac	ctcagcttcc	cgagtagct	gaactacaag	3360
	tgttgtct	cacgccccgg	taattttgt	tttttagtag	agatgggg	tcaaccatgtt	3420
	ggccaggctg	ggctcga	cctgac	ggtgc	atgcctca	ctcgcaaa	3480
	gctgggatta	taggcatgag	ccacccg	cgtcccc	tctaggt	aaaa	3540
55	tgtggcaac	aaggctgc	tctgg	ttt	tttt	tttt	3600
	aaatattca	cagtggggac	tgggt	gggg	accat	caga	3660
	gataccaggc	cttaacc	tagtgc	gg	atc	gggg	3720
	ttatggggaa	aaaaaacct	caaactgt	ttt	tttt	tttt	3780

5 tcatcaacac agaattctgt gaccaaatgt gtggggctt ttccccacac actacacagc 3840  
agacaacagc taggtgtccc ctccgattcc attccaacgc tgccccaca cccagcta 3900  
tttgttatt ttggaaagaga cagggttca ccatgttgcc cagagctaa gcaatctgcc 3960  
cacttcagcc ctccaaagtg ctgggattac aggctgagc caccacaccc gacttttta 4020  
aaaaaaaataaa aataaggccg ggcgcagtga cccatgcctg taatccagc actttgggag 4080  
5 gccgagggtgg gcagatcacc tgagctcagg agtttgcac cagcctagc aacatggcaa 4140  
acttgtctct aaaaaaaaaa aaaaaattac aaaagttagc cggtgtggg gcatgtgctt 4200  
atagtcccgag ctacctgaga ggctgaggca ggaggataaa ttgagcctgg aaggtcaagg 4260  
10 ctgcagttag ccgtgaccc gccactgcac tcaagcctgg atgaccatc ttacaaa aa 4320  
aaaatttttgc ctggagctgc tcacagaact caaggaaatg cttacttaga ttactgggt 4380  
tattatagag gatattgca agaacaaga tgaagagatg tgtagggca ggtataaggg 4440  
aaggggcagg gagcttcacg ccctccctgg ggtgtaccc tacaggaaacc ctcaggtgg 4500  
tagctatgcg gaagcttc acaccagtc ctcttgggtt ttacggagg cttaagaca 4560  
15 gcagcattgg gcatggactt ctctaaaag tgccttaaga ccaacaatca agaagggtgg 4620  
gaagattaga gtcttgcctt gggcaggaa atggaggcga ggaggagtc agagagattc 4680  
tgtttctca gacactcccc aggcttaagg tacacaacat tataacaaga gactgtaca 4740  
aaggctgttag gagttaccag ccaggaactg tggatgaaaa ccaatatatt tatatatata 4800  
ataccacaag ggggtccaa agtggcagtt agggacaggg agtacttgc tagcagtgc 4860  
acaccaaccc atctggaaat atttaaatat taaaacaatt ggtatggcta tactagttt 4920  
20 tgattatcag ctttagtttgc gtatcaattt gcaagatagt gtcttaggtt gccacactct 4980  
agctgtgttag caccacgaa agaacttaac ttctctagcc tgtttcttc tctggaaagaa 5040  
aggggttcc acgccttaac tcacgtactc cccataacta gactggaaat tatctccctt 5100  
gtacagatga gggaaacagac acagaggtga taagtgaga gcccaaggtc accatctgg 5160  
aagtggatga actaggattt gaagccagac ctttcataaa atgatttctc agtcaaaag 5220  
25 gttttctga agattcagta ggctcaactga tagaaatttgc tgggtgtgg ctggatttcc 5280  
atcaagagtg gccattacta ctcccacccc tgccctcta taaaactccag atgttccaga 5340  
cctctcatct ctccctgtgc acacaaggcc ttttcacatc tgggggttctt atgatccctt 5400  
ctgttgcgtt caagaatgtc ctcttcttcc tttttttttt tttttttag atggagtc 5460  
actttgtgc ccaggctgga gtacagtagc ggcatttcac ctcactgaa ctttcaccc 5520  
30 gcatcagcc ccttagtagc tgggattaca ggcagccacc accaccatgc cccgctaatt 5580  
ttttggattt ttttagtagag acagggtttc attatgtcag ccaggctgg ctcaactcc 5640  
tgacctcagg tgatccattt accttggct cccagatgc tgggattaca ggcaagagcc 5700  
accacgccc gcccctcc tccttttttgc gctggagaa ctcccttca cccttcaag 5760  
cccaccacaa acataagaac ctctataactt cttggccctt gaaataactgc ctctgccagg 5820  
35 agccttctg tgacttctt ctctccctt tcaccaacgg accggccccc cccccccacca 5880  
accccaccac acacacacac cactactgtc ttccactgtt ctcctgaca gtagagaacc 5940  
aagcagggcc agttgtatgc gcttcagta tatctcttac atgccaaggc ccatgcact 6000  
gggatacaat ggtggaaaat acatggtccc ttcaaaatgtt ggatgtcaag ttaatgctg 6060  
40 gggactaaag agaaaaagttt cagattggaa cttggaggtt gctggggcaaa aggaccattt 6120  
gcatcattgg cagggcaact tcctaaagaa agcacctaaa tctttggctt taaagacaga 6180  
tttcataatt ggcagaggag aattctaatg ataccctatt gcctacaggg ccccatctaa 6240  
tttgggaattt ctactttata ccaagataag attgcccattt ttagcaaaata aaaacagaag 6300  
acatccaattt aatttttttgc ttgttttttgc ggttttttttgc gggagatgg tgcctacta 6360  
tggttgcgaag gctgtgtca aatttcttggc tcaaaacatc ctctccctt ggcctccac 6420  
45 ttcccaaaatg gctgggatta caggcatgag ctaccacacc tggcccttat ttattttttt 6480  
attttaattt tttttttggg acggagtgtc actctgtcgc ccagggtgg ggcgtgtgc 6540  
gcatctgg ctcaactgcaa ctctgcctc ctgggttcaaa ggcattatcc tggccctggcc 6600  
tcccaagtag ctgggactac aggctggtgc caccatgccc ggctttttt tttttttttt 6660  
ttttttttt gagaaggactt ctgtctctgt cgcccaggct ggagtgcgtt ggcacgtat 6720  
50 cggctcaactg caagctccgc ctctgggtt cacgcattc tccctgcctca gcctcccgag 6780  
tagctgggac tacagggcc tgccaccac cccgactatt tttgtattt ttagtagaga 6840  
tggggtttca cctgtttagc caggatgtc tgcattctt gaccctgtga tccacccggcc 6900  
tcggccctcc aaagtgtgtt gattacaggc gtgagccacc ggcggccagcc tactttttt 6960  
tattttttaa gagacagggtt ctgcgtcattt tggccaggct ggagtgcgtt aggggtgatct 7020  
55 gtaggaaaagg ggcttccagg cttaactca tgcactttttt cttttttttt tttttttttt 7080  
agctcaactgt aacctcaaaac tcctgtgtc aaggtaccc actagccctt tttttttttt 7140  
ctgggactac aggtatgcgc caccatgcca ggcttaattt ttactttttt tttttttttt 7200  
tttttttttgc gagaacggggg tctcaactata ttgcccaggc tggcttgc gttttttttt 7260

5 caagcgatcc tcctgcctta gcctccaaa gtattggat cactgcaact agcccaaaga 7320  
attaatacgt ctatgttcca tgtgatattt gggacatact ttctaaaag gttgtatctt 7380  
ttggatataa ttgttatct gaaattcaaa tttaactaga cattgtatat tttatacggc 7440  
aaccacacac ctggacaat caagacattt cctgaaggta ccaggagaca atgcccata 7500  
gcctacactt ttcaagcccc acgtcacaca aggccccctc cagagtattt cagacgttc 7560  
tagggccat cccttggtt acaagtccta ctccattacc gcctatggca gccaaactga 7620  
aaggcaaaaca cagtgttgg gacccacaa tgccctggc ctatagcgt caattcccaa 7680  
gatgcccgccgt gtgaacacaa taggcaccccg ttccaatgtt cgagcaaaaga gaccaggc 7740  
aaaccttcca ctacgggaca ataacggcca gttccacaa ttctgttgg cagttctcc 7800  
10 caggatgcct taggcctata gcgaccaccc tcccagactc cccgtgttgg agcgctccaa 7860  
gcctccagga cggtcagcgg caggtgttgg ataaaagaa ccgtctcga caaggatctg 7920  
ggacactctt tcccaggatg caccaggccct acgactagcg gaccgactcc cacagcgctt 7980  
caaggcggag cgctcggtt tccaggatg cccaggccg gccaaacgc gttaggggag 8040  
aaaaagaagc cctcggtca ccacggcccc agaccgcgg ctcgggttgc acgggagtcg 8100  
15 tcgctccat catgcagcgg ggccgttagcg cccgcttccc ggcatgcctc ggcacccct 8160  
gcccgggaca ctcacccggc ccggggggccc ccgctccggc tctggggcgg cggctgcacg 8220  
ccagcctct ggcctcggt cgcaggatgg ttaggacagc ggcaggggg cgtgaagagc 8280  
ctagggcgct tgcgcggcga gacggactag tcctgttagcg ctgtggaaag aggggctatg 8340  
20 cgctcgccggc cgctcgacgag acccgccggc gggccctgt gcttgcctt tcgctgcctg 8400  
gtttacttg gtacagcccc cgccccaaag gaacaagaag ctgaagggtt cgcgctgcg 8460  
tgtgcggggc aggaacgcgc cttacaaaac tggatgcgc tgggggttgg gggcgctagt 8520  
tcggacttgg aacctggggcc gaggcctgt tatttgcata atcctagcgc gggacaataga 8580  
aaggcctccc gcaactggaaag gatgtattt catattcccc ggaggggcct tactccagag 8640  
25 cgcaatgtt agcatatggc gggggcaacc tgacaaagc gcacgcgcg aggactgca 8700  
gactgacgccc aagtgggtt cttgtcttc tgggggatc agttgcate ctgagagagg 8760  
gcacgaggcc caggaccctt cccaaaccagg ataaagggtt attgatctcc taggtgtcag 8820  
gccccatgtt ggcggatttt gtgtttctg cagtgaacca tactctgtt ctcacggcac 8880  
cccagtcgaa ggagataacgc acctaattt acaactacta cccagaaggt cagacctgg 8940  
30 gtggagaaaca caggggggctg tggagccctt agaggcgctt gcccggcct ctgggttctag 9000  
aaagacttcc aggagggtgtt gatctttaag ccaagtaega ataggagccca actagaatgg 9060  
gaatgggtct ggcagaatga actgcaagcg ccaaggccca gaggccaaaa aaaaaaaaaaa 9120  
aaaaatagaa ggcatgttt tgattgagga agcaagagca gtttagtatg cctagaaccc 9180  
aactggagac gggaaatgtt tetatagacg atgttagagt tcaactatgg ctacattcca 9240  
gtttcctgt aagtgtactt gtcacattt ggcttaaaaac tccccaaag gatccctt 9300  
35 agaaaaaaa aaaaatccaa aaatctttt catggcctca gggctataca cctggcttgg 9360  
ccgtgtttat ctttctgacc ccacacttcat ccttcttccat ccatttctgt ccagtcac 9420  
cttaccccaa actctttacc agctcgccgct tctgttcttccat cccttcttccat 9480  
tgctttccc tctgacccctt gaatacctac tctgttcttccat ccatttctgttccat 9540  
gatgtcaatc tgagaggctt ttctgtatct tctgttcttccat ccatttctgttccat 9600  
40 agttatggat aaatcggtt tggccatgag ttgttgggg tttgtactgg catgaagagt 9660  
acatggggct gggcgccgtg gtcacggccc gtaatcccaag cacttggga ggccgaggct 9720  
gggtgtatcac ctgagggtcag gagcttgaga ccagctggg caacatgggaaatccctg 9780  
tctattaaaa ctacaaaaat tagccagggg ttatgggggg tgcctgtat cttgtctact 9840  
45 tggaggctg aggcacgaag atcaacttgcg ccctggaggg agagggttgcg ttgagtcgag 9900  
attgagccac tgcactccag cttggccac ccagcgagac tctgggttccgc ctgttgcata 9960  
ccagcaactt gggaggccca ggcggccggc tcacgtcaga agatcgagac catcctggcc 10020  
atccttagacc atttctacta aaaatacaaa aaaaaaaaaaa aaaaaattag ccggcgctgg 10080  
tggcaggcgc ctgttagtccc agtactcg gaggctggg caggagaatg gcgtgaacac 10140  
gggaggccga gcttgcagtg atccgagatg ggcgtactgc actccaccccttccat 10200  
50 gcgagactt gtcacaaaaaa aaagagtaca tgggacgtt tttgttgc tttgttgc tttgttgc 10260  
ggtttgaagt ttccataat gacaatggca taccacatca ccatactctg catttatatt 10320  
aatagttctt atcacaatct gaactttctt tgcttcttgc tttgttgc tttgttgc 10380  
aaagcttcat gagggtaaaga atggagtcgc cttttttccat tttgttgc tttgttgc 10440  
agcaggatca gatttcagat tagtgcgttgc gttttttccat tttgttgc tttgttgc 10500  
55 tattcaccat ggactctaga actttgagca gcacctggca catcgtaaga gttttttttt 10560  
taaagtttaga ataatacattt taaaatgtac atgaatgaat gagaggcctg ggttgc 10620  
ctaaagatgtt ttgacttggt ctaaaaggtga tggggagctt ggcacaaaggtt ttgagatgtt 10680  
aactttaatt caaagttccc ttggagacta atgtctgggg tagggggaaag ccagggttaag 10740



tcttagccctc ccacgcatt ccatcctcg caaccaggag tctgaggctg cacagcttc 14280  
gtattgggga gtctgagcct ccagattcct cctccctcg gatccaggag tccaggccc 14340  
agatccctat tcgtccaggt ccccgactct ctcttctca ggacctaggaa atccaggctc 14400  
tagctccctg tttgtccagg tcctcagctc tctctctt aggaccaggaa agtccaagtc 14460  
5 cctggccct gttcttccag gtccccagct ttctcttctt gaggacgcag gaggccccca 14520  
gagctcacct ggggttcccc gtgacagcac acgtcaacac cagctgtct ccctccctca 14580  
ccacagcttggaggcatga atccggggcg tgggggagtc tgtaggcaa aagtaagagg 14640  
agagagtagt ttccaagcca tcacgcagga caagggggac cctcgccggt gcgggtggct 14700  
ggcgttggga tcccttggt cctggccgc cggtcaactt cactgcacat ccagcacgt 14760  
10 ctgcgtctgc ttgctgtgtc cggagggcag cgcctgggtc tgccctcact agatgatgat 14820  
accaccgtcg tccttacggt ccacacgaaa cctgactgtg cttgccacgc tccagacctt 14880  
gccatttcc tggctgtgc tcactcctgc cacacccgg tcaagacactg tcaggccaca 14940  
atccggctc catccaccca cccacccgg acaacggccaa agcaggctat ttgccaagct 15000  
15 ccacccctt cccacaggcc cgccttcttgc tccctcaagc tacgccccctc ccctaaccaa 15060  
gcccacgtgc tcctcccaa agctttttcc tctttcacgc tcatgtttc tgctctatca 15120  
atccatttaa ttgctatata tataaaaaca taaaattata tatatactta gagacagggt 15180  
ctcacaatgt tggcaggtt gaactcctga cctcaagcaa tcctcccatc tcagcctccc 15240  
aaagtgtctag gactacaggc gtgagccacc ggcgtcgaca tcaaccacta catattgaat 15300  
20 gttccagtgtc tgtaaaaacc tggctcttgc tccacatata aaacaacctc tcctaagtcc 15360  
cacctccctcc ccatcccttgc tcagcactcg gcccagggtt ctttcagct cttgcgggtc 15420  
ccggtaccag cgcagggtgg cagccggacg ggaccgcgga acgaggcagc tgagctccac 15480  
ctcgccgccc tctaccggct gctcccgac ctcaccaca ggattctctg gggccactgc 15540  
cgcagggaga agggaaagtaa ggggttaaag aaggcacgaa cgtgggctca aagcgatcga 15600  
gctgcctgtt cccagcggacc atagggaaacc agggtcccaag gtggcagggg tcaaagggg 15660  
25 gaggtcagga gccagatgcc catccaggat gttaaaaata gccatggct gaaagtctca 15720  
ggagaagaga gaagcagaga agaaaggagg agaggatgcg tctgacaagg gggagggcgt 15780  
taccttagtac cgtgagcgtg gcaatctgtt ggtgggtgtc ttctgtgttag agctggcaga 15840  
aatagcccccc ctcgtccctcc agggccggcat ctgagagccg gatccgcacc cggcgtgggg 15900  
30 agaactctc aagctggaaa cgctcactt tcaaggctag agagagttag ggggaagggtg 15960  
tgaatttcgg gaggcttgc ctcacaagtc ccacccttcc gacaggagct tagagtccag 16020  
ccctctgcct cttttctcca gccatctcta tgagttctgag gtgtccaaact atttactccc 16080  
ttgaggaccc agcattttc aagtcttctt gcctgcagga ccagcgtcc gggaccccaag 16140  
cccttcttc tccgagaccc aggagaccaa actctcagggt gtgtcttctt tcaggacatg 16200  
ggagcctggg ccccccgcct ctcttcttt aagactctcg agtctggtcc ccagcactca 16260  
35 ccacgggtgc cattgaagaa gaggtctgc cgggtgggt tctggatgac aactatggac 16320  
ccatcatact ggtcagacg gcaggtgatc tcagccaccc caccctcactg cactgtcag 16380  
ttctctgtct gtacttctg tccttccccctt ggacgattag acaaagagac aggatagaag 16440  
acttaactgag agctgcaatt caatttttc ttcttcccttcc aacactccaa 16500  
40 tccctctt tcccctcatt cattccattt cactgaacat ttcttcagg cttagacttca 16560  
ggacaggggag gaaatctgt ccctactcta aaagagctgc agtcaagatt tagtagaata 16620  
tgctctaaatg agggcagcac agggcacactt aggagcccaag agcaaggag gactattata 16680  
gaattgccta gagagatggg tagccagaga gggctctgca agaaagctcc attggatctg 16740  
gatcttaaag agtaagcagg aggtgagcg cggtgctca tgcctgttaat cccagactt 16800  
tgagaggccg aggtggccgg atcgcaggt caagagatag agaccatctt ggcacaaatig 16860  
45 gtgaaaccct gtcactacta aaaatacaaa aaaaaaaaaaa aaattactgt gggtgggtgg 16920  
tgcgcacctg tagtcccagc tactcggag gctgaggcag gggaaatcgct tgaacccggg 16980  
agttggaagt tgcagtgtgc cgagatggag ccactgcact ccaggctggg cgacagagcg 17040  
agactctgtc taaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaaagagt aagcaggagt tcacaagggt 17100  
50 tgggagactg ctgtgtttc accaagcctc atctttcaca cctggcaca tggtagtgc 17160  
cgtttgcaaa gatagccgtatattcttctt gtcctggac atgccttttgc caagttgatt 17220  
ttgccattcc tcccatttgc aaggcacttt gtcctctact agtctggta agccttgaga 17280  
gttgccttgc ccaatagaat ttgtctagaag tgatattgag cctaggccctt aagaggccctt 17340  
gtacttccca tcctgcctt aagactgttg catgaagata cccagacttag tgccttgc 17400  
gatgaacaat catggtaaaa gagaagccca gccggcagcc agcaccaatc gccagctgtg 17460  
55 tgagtgtggc catcctggat catccagccc cagctgcccc accagctgac agcagccaca 17520  
caagtgcacc cagttgagac caataaaaaga tctgccccatc tgatacagcc caaactgtctg 17580  
aacccccagaa tcatgaacaa ataagggttgtt ggttgggttta agctcttaag ttgtgggtga 17640  
tctgttctac tgctaaagtt aactgataca atacataatt aggctatact tcccaagcatc 17700



5 gtcgcgttagc cttgctgtcc ctcaaaacatg ctgagctcg tcccaccaca gggcctttt 21240  
ccttttcttc cttctgcctg gaatgttctt ctccccacct cccaagcccc atcttccctag 21300  
ggctgactcc tggtccatt tgggtctcaa atcatatcg taccttctca gagaggcctt 21360  
ccctcaactgc tcatacccttc acctttagaa cactttctt tcttttaaga gacaaagtca 21420  
5 gcccagtgcg gtggctcactg cctgtataac cagcaccttt gagaggccaa ggcgggcaga 21480  
tcacctcagg tcaggagttc aagaccagcc tggcaacgt ggcggaaaccc cgtctctact 21540  
aaaaaaaatac aaaaattagc taggcagtgg tagcccgccc tactcaggag gtcgaggcag 21600  
aattgcttga acccaggagg cagaggttgc agtgagccg gattgagcca ctgcacccca 21660  
10 acctgggtga cagagagaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaag agacagggta 21720  
ttgctctgtc acccaggtc gaggcactg gtgcaatcat ggctcaactgc agcctcgaaac 21780  
tcctgggctc aagccatcct cccacccatcg cctcctaagt agctgagatt ataggctct 21840  
cccaccacac ctggctaaatt ttgtgtctt ttgtggagac acagattctc catgtgccc 21900  
aggctggctc ccaactcctg gggtaaaagg atcctcctgc ctcgcttcc caaagtgcgt 21960  
15 ggattacagg cgtgagccac tgccctggc ccagaacact tgctatttcc tcaccattgc 22020  
tttattttttt ctatgaagat ttcaactggaa ttatcagatt aatttgccta ttgtttact 22080  
gtctgtttgt cacccatgac tggaatgtat actcttagaa ggcagggata taatccaatg 22140  
ggttactgc tgcaccccta gtacccagaa gagtgttgg cacctgataa gtgtctgggg 22200  
aacttgcata atgaattaca tggtcagat gggatatctg ttgccttcc ttctcttctt 22260  
20 tttctttctc tctttctctc tctctttctt tctctttctt tctttttctt ttttttgaga 22320  
taaggtctcg ctctgtcacc caggttagag tgcaagtggg caatcatggc tcactgcac 22380  
cttgaacatg tgggtctcaag cgatccccc gaggtgcgtt gctatgccc gctaattaaa 22440  
gaggtgcgtt aatatctgc ccaggttggt gcctggccctt aaaaaaaa ttttttttt ttttttagaga 22500  
25 gccttggcct cccaaagtgc tggattata atcattattt tcatctaaa cacctagtt 22680  
aatctcattt cagcccgaca actttgtgac gacctgtggg caagtgcacct taccttcgg 22740  
gatcccagct caaccacttgc ccattgtgtt agatgccag tgccctgcctc ataaggatga 22800  
agccctcgat gccccatcta taaaatggga gtcagactcc tggatgtgc aacccctgg 22860  
gccccgtcc tgaagctcg ggagccctt aacatgccc aacatgtcg aatcatctcg 22920  
aacatgccc tgcattgtgaa aactggcatg cacattctgg tgctttaaa aacatctcg 22980  
30 agccatccca cagatcttgc acctcaagac tggttcagtg cttagcccccc atttacaga 23040  
tgtggaaat gaggcttagc gggcccccagg caagtcaatgc gcaaaaactca ccatctctg 23100  
ggagccatca ggttctctg gatctgcccc caccaaaattt atccctctgt ctctgttgc 23160  
gggtgcacat ggggtgaggg tgggggtctt ttgaaaaactt ccctccccct cctgaggag 23220  
cagtaaccaa cagttgtctgt gccttggaaa ttaatgtctc agcagctttt gtttgggggg 23280  
35 tttgggggtgg tggggggggg actttctgtt cagaggggg ctgagctttg gggactgggg 23340  
cactggccct ttaaactgtg ttgacagccca ggagctgtca tggggatggt gtttggaaaa 23400  
ggggacaggg agggtttggg aaagagtggc ggagccatca atgcgttgc cccaggaaatc 23460  
cagcccccaa ctatctctc tcccaggacc cagggatctca ggctcccaagc ccctccctca 23520  
40 tcaggttcca ggagtctggaa accccggctt tttccgcct tagaccagg aattcagccc 23580  
ccaaccaccc cctctctcgat gttttccaaa tccagacccc tagccccctt ctgcgtcagg 23640  
acccaggagt ctgggtctgc agcagccccct tccttcaac cttaggttca gagcccccaag 23700  
ccctctccata gcttagacac agggtctgg gcctccagcc ccctccctt tcaggaccca 23760  
ggagccaggg gtccagagta cacagctgtt ggatgtttcc acggagacta agcagggtgg 23820  
45 gggggagcgt tcctgggtcc tgagtctggc aatacccaag ggagtctcaa ggtcatagtt 23880  
ccgggaaggt caccacccacc ccctctgtat ccgctccccca gggggctctt ggcacccctc 23940  
ctccctccccctt cttctccct tagggaggtt gtacatccct gcgtctcgat tgaacccccc 24000  
tcagccccccctt atcaatggcg gagtccgaac atcctcgacaa aaagctcaat ttcttccccca 24060  
gctcagccctt gtgaaggcgc ctgtattcgc aggacctagg cgtcagggtt tcagccccctc 24120  
50 ctccctcaga aacctcgactt ggaatcccccc gcctccagcc ccttctccctc tcaggaccca 24180  
ggagtctgtt cttctccatccc ttcccccctc aagacctagg agtgtggact cccagcccc 24240  
ttttcccttcc ggacacagga gttccagcccc tcggccctt cctctttaa accccagggtt 24300  
ctaagacccccccctt agcctccctc tccctcaaaatc tcaaggatctt aagatcccaag gcccctcc 24360  
cctcagactc aggagtctaa gatccccaggc ccctccctcc tcagactcgag ggttcaaga 24420  
ccccaggccccccctc agactcagga gtctaaatgc ccaggccccctt cctccctc 24480  
55 acccaggagt ctaagacccccccctt ccctccatccc tcaaggatctt aagatcccaag gcccctcc 24540  
ccctccctccctt tcagactcgat gagtctaaag cccaggccccccctt gacccaggag 24600  
cctaagacccctt ctccttgcata cccaggatgc taagaccccta gtcaccccaq qagtcccaqqc 24660  
ccttagacc cattagttca gggccccaga ccctccatccc tcagaccccaq qagtcccaqqc 24720

ccccagcccc tcctccatca gatccagccc ctccctccct gaaaactttt gactctaact 24720  
 ccccagtctt caaccccttag aagcacagtc ctgcctttcc tcaatcctct gtccccctcc 24780  
 atctggggac ctaggcatca ggtggggcg taggggttag tcagcaacct cacacacaaa 24840  
 5 gtcggccgtg tgccccccac attccctggga tattcgggac tccctggatt ccaggcctca 24900  
 gccccagcca gggagtgggg agtccccag aggtctccct tgggtgtggg gtacgagagg 24960  
 aattcctgtct ccgggaaggg tgcaggcctg cactgagctc cctctgtcc aaccctccacg 25020  
 cccagtgcctt ctattcacc ccctcttccc agaagagccc aggtctagca cctgccccctt 25080  
 10 gccccactgg gtgcccacgg aggagctgc gtgcctgtcc cctatggcc tgggtgtcc 25140  
 acaggcggaa atcagtgggt gettccgttc tgatgccaca ggccattggta tgctggcg 25200  
 tctgactgtc tccaggccac ccccccacccc tcccagagag agaaagctgc ctttgttcc 25260  
 tccaagatgg ggacaggcca ggctcgacg acattaaccc agccttaggc cccagccctg 25320  
 ctgtgtctaa ggtcttgaa tccactcgacg aacctgaccc ccaccccccag gctctgggg 25380  
 cacaggcgcc tggctcatgg gtgggtggg ggggggggtca gtgatagaaa cctccaaaac 25440  
 ctgttccttg gggtgactca caatggggg agggtcccccc tattctcaag agtggctgg 25500  
 15 cagaattttt gcaggaaaaaa gtgatcgacc ctgggaaggg aacattattt aggaccaac 25560  
 aactgcccccc tccacaagac ccctcaactc ctaatagctt ctctattttt tctttgtatt 25620  
 ggatatctgt ttctcttctt cttttctgtt tcacccagg tctggctcg ggtcccattt 25680  
 ctgcctgggt gcatccctgg gcaggcaacc catccctccc tcttgccttc tctcctctgc 25740  
 ccaccccttggta tccttcttgc ggataaaatc tcatcttctt ctgctatgtc cagaagatga 25800  
 20 atgaaccagg agagagagaa catgtttta aaatggcga aatgcacccc atctcccccg 25860  
 attctctgt gctggcaag gtgagagagg aagaagtgc taagagagaa atgtgggaac 25920  
 aacagatacc ccctaaaatg tggtagccaa ggccactgag aaatatccaa tgaaaaggag 25980  
 agcaggaagg gcccctccaag accacatgtc acagcctctt accccatgtc ttacagaacg 26040  
 ggaaagtaag gcccagagag ggacaaggac tgatgcaaaa ttatactaaa ggttcttgg 26100  
 25 taaggcttgg acccaagtcc ttagctccc agctgagagc tcttccatg acaccaagct 26160  
 cagtttctac tggtaaaatc cacatactat ttactttaga gaaagtttac agagagggtt 26220  
 agggtgcacg gaagcagtga ctggaaatc aaacgagggg cagggctgtac gacctaactc 26280  
 ccagaagcac cagagaaagg ctttgcacg gggcggtgg tcaccaaag ctatattctg 26340  
 atcctgagaa ttcaaagtct gatgattcta agctgtcagg attctaaatg tcatagatgt 26400  
 30 caagatccag gaactccaag acatcaagat ttacacgatt ttaagacgtc aagatgttag 26460  
 catgctaaca ccatacactt tctagaactt taaagggtgtc aagattctaa agccttctgg 26520  
 attctagaat cctgttagatg tcagcattct aaagttccat caggttcttt atttactgg 26580  
 ttcatttagtt ccaggattct atgagcctgg tggtagctt aaaaaataaaa gataaattaa 26640  
 aattgatgga aatgtcaactg agtacccaa gtttcatct gggaaattgt ggcatgtctg 26700  
 35 ttgttaaagaa aggaggtaat gatcaagtt ctaaaggact cacagaagac tagagaagaa 26760  
 agaaagacag tgagaggaca gtttgcctt tcatcttgcg cgagggtgagg atggctctgc 26820  
 ctcaaaacccct ggagtggggaa acatgtaaacc gcaactcaact tgccagaaac cccttcacgg 26880  
 tctgagctgg cgttccctt catgtcaactg agttcaacat cctcaacttca cagaaagaga 26940  
 aacagaagcc tggagaggg aagggtttt ccattggctg cgatggcaaa tggcaagagc 27000  
 40 caagatttaa gcccaggccg ccagccccat gcccacccat tataactctt ctcaccaatc 27060  
 tctggccgaac accccagccct cctgtttctg ctagccacc ttcaatcctt ctgttccctt 27120  
 caaaaagtggc ttatccacc agggagggtt gaccgtggc aggtcaaga cttacacagt 27180  
 gtgagagtgt gtgtgggtga catttctga ctttgcctt atttcaggg tcacccaaacc 27240  
 tcgggggtct ccagttctc acagtgtgtg atgagggtat gtggatggct ccctggatgt 27300  
 45 cttggacagg ggcttctctg tgagtcaagc ctgggtgtgt gaatgggtga cgagggtttg 27360  
 gagaggcatt cgctgaatcc acgtgtgtgc ctacacgca aggtccccca ttctcaacttc 27420  
 cccacacaca tgcacacaga tttccctc cagggcttt tagaatggcc tgcctgtactg 27480  
 aattcctttt cagggcaca gagggataga gagggggagg aaggtaggtt gggatgggg 27540  
 gatccggga tggaggctgt aagcgttagag agaggaggca cagcagaaag acagggtgg 27600  
 50 agatagtggg acagagaagg gggaaagaga caggtgacag aaagggttag agaaacgagt 27660  
 gacagaaaaga caggggacag agacaagggg atggggcaga tagggacag agaaaaagg 27720  
 acagaaaaaaac aagggtgaca gcgagacaga gacaggggacc aagaataggg gcaagagagg 27780  
 agggcagaaa tccggggaa agagaataga caggatgtt gggggacag agtgcacccag 27840  
 gaaaagggggaa cagagaccag gggacagagg tagggggacaa agacagaata gatgaggaac 27900  
 55 accgaggccaa gaagagaggg agacagacag aaggaggac aggacttcga gactgagg 27960  
 tagaggacaa gggtaaggggg aegaggagcc agacgggggg gttcagagac gggcggacag 28020  
 agggacgcag agactggaca gaaggacagc gggacggcc tggggaggcc ggacttgg 28080  
 gtgttaggggg gtctcgccctt ctttgtccccc gcccggatcc agctgctgcg ggtgggggg 28140

	ctgcggcacg	cgccgggggc	cccgcccccc	ctcccccgt	cgtcgctccc	ggctcccgcc	28200
	ccgcgtcg	cttggccccg	gggagggggc	ccggccgggc	cccgccgcga	ttgttcggcc	28260
	tctcgccccc	cgaggctgcc	gggtgtcac	cacagcgcc	ccccggcccc	agcccgcccg	28320
	gccgacccccg	gccccccgacc	ctaacctggcc	ccgcccgggc	cgcccacage	agcagcagcg	28380
5	gccactggaa	cgccggggcc	cgccccatgg	tgccggccgc	gccggcgccg	ccgctcgctc	28440
	ccggcccccgc	acctgcacccg	cccgccgcgc	ccgccccggc	ccccggcccc	cgccccctgc	28500
	ccgccccgggg	cgggggcgcc	gaggccgggg	cgggggccgg	gaggggaggg	ggagacggag	28560
	gagaggccccg	gagacaatcg	gggggacggc	acggtgggg	aacggtgcgg	gtgtcgaaag	28620
10	ctggagagga	gaggggtgag	gagggcggga	aggggtgcgc	gggagggcga	cagcggcg	28680
	ggagcagggtg	ggggatctcg	gtgagcgcgg	aaaatggagg	gtgttgggt	agggtgtctc	28740
	gtgcggggccc	aggtgctgcg	cgcgaggggt	cggagttgt	ggcatgcagg	gtgttgcgc	28800
	tgcgcggagg	ggaggggtggc	agggtgttc	tggaggctgt	gcaagggtgg	gggegegggc	28860
	gtcgtgggggt	gcggtgtgt	cgaaggaga	gcgtggccag	cgtacgggg	gagcgtaaagg	28920
	gagggagtgc	gacgtgggaa	aggtgagtgt	gagaggcg	ctggggcag	gtgggtgtct	28980
15	ggagtcttagc	gagaggctgt	gagctgagcc	accgggacag	gggaggctgc	agctggaggt	29040
	ccggagggtc	cgaggtcga	ggcaggtcaa	gatatctcca	ggcagggcgc	aggctggggc	29100
	tcaggagtgg	gttgggtca	gttccctccc	tccctctctc	ctgtctgac	ctgaaaacc	29160
	cgtgtttccg	cgtcattctc	cgggaggggc	cccctgaaag	tgaactaact	ggaaggaagc	29220
20	ctgaatctg	gttcccagga	gggagggct	cctgtgaaca	ccttccaagc	cctggcg	29280
	cctctcttcc	ctgtgtctc	cctggccca	cctctctccc	tctctctgca	tgtat	29340
	tctgccttcc	ctctctcccc	atcttgagg	gtgactcacc	cctccagact	taggtccctt	29400
	ctccctctg	ggagtgggtt	tccctgagcc	cacttctgt	acaccctgta	gacctgatgc	29460
	gggatcatta	cctatggac	ccagaaagag	tgagaaacca	tggaaagaag	gcctcgac	29520
	ctctcatgcc	catttgcag	gcaactgag	gtccagaagt	gccaattatg	acatcttcc	29580
25	cttccccctt	ccccctcccc	cgcccagacg	gagtctcg	ctgttgccca	ggctggagtg	29640
	cagtggcacg	atctcgactc	actgcaaccc	ctgcctcccc	gttccagtg	attctctgc	29700
	ctcagccctc	cgagtagctg	agattacagg	cgcccgccac	catgcctagc	taatttttat	29760
	atttttagta	gagacggagt	tttgcctatgc	tggccaggt	gtcttgaac	tccttac	29820
	aggtgatcca	tctgtctgc	ctcccaaagt	gctggattac	aggcgtgagc	caccatgcct	29880
30	ggctgaaaaat	ccttactttt	tatccgact	aaaaaatttt	acatccagtc	ccacaaggga	29940
	cttcagcttc	acacaccctt	tctgtctca	gtacc	ccagttatcc	tttctgac	30000
	caaaaccata	gctaccatca	acccttgc	cccaggacca	tggctccag	tgtcttctc	30060
	gtcttcaggg	tccaagtc	catcaactcc	tgtgtctca	ggaccac	tccagc	30120
	ctctctgtcc	ttcagg	agctccatc	aaccctgt	aaggcaggacc	atggctccca	30180
35	gcatcccttc	tgtcttcagg	gtccaagtc	ctatcaactc	ctgtgtcccc	aggacgatgg	30240
	ctccagcaat	cctctctgtc	ctgagagccc	aagttctaa	ctgcccctgt	gtccccagat	30300
	ccatagccct	gagcaacttc	cttcttttc	agtcttcage	tcccagtt	ctgttagact	30360
	gggaagagat	agtctcta	cctctttca	gggtc	acat	tctgtgact	30420
	ggagagggat	gtttgatctg	cctttggaa	actggtccaa	ggggtaacta	gtagttgc	30480
40	tttcccgcag	gagcaatag	gcccgtcac	tctgtgtct	gacagatgtc	tcctgctcca	30540
	gtgtgggggg	aaccttggg	gatgtgggt	tggttctc	ctgtcatct	taagtccac	30600
	catccatgt	gaagacatca	caagagtgt	gttctcgt	ggcgcgttgg	ctcacac	30660
	taatcccagc	actttggag	gccaagggtgg	gccc	atggtcagg	atgtttagac	30720
	cagcctgacc	aaccggccaa	catggtaaa	cacatctt	acccaaaaaa	aaaaaaaaaa	30780
45	ttagcaaggc	gtggtggcac	gtgcctgtaa	tcccagctt	tcggaaaggct	gaggcatgag	30840
	aatccccctga	acttgggagg	cagagggtgc	agtgagctt	gatcatgcca	ctgcactcca	30900
	gcctgggtga	cagaatgaga	ctcagtctaa	ataataataa	taataataat	aatataata	30960
	ataataataa	taaatagaat	agtgtcc	tccctatctt	acttcagggt	accctgtcca	31020
	ttagggattt	agtgc	acagcaagt	caacccaact	ggtttgagag	aaagagaact	31080
50	ggttcacaca	taacaaaaag	tcctctat	gctggctt	gcgaggct	tcaatctctg	31140
	tcctaaggat	gcatggctcc	cctccgt	caagatgg	ggcagatacc	cctggggcca	31200
	gattcatatt	tgggtgtatt	aagattctgc	aagagagaga	caac	ttcacac	31260
	tttcaattt	ttgcctgtcc	ctggtagac	tcggagac	agctttg	ccat	31320
	acttcaata	acaccgtttt	tgcttaagtc	agcacaaaca	gattttat	tttgc	31380
55	aagattcctg	aacaacaact	tcagagccgt	taacaatgag	gtcctgatca	caagctatgg	31440
	tataggacgt	gagaatttgc	tccctagcct	caatatctgc	tggagggcat	catgaaataa	31500
	gtat	cttctat	ccactgttag	gcatcat	atatataatc	ctaac	31560
	atctctgcca	taggttca	taggcaatgc	agtcttagcc	tcaatatgtt	gtagggaaatt	31620

atggggaaagg tgaaattata ctaaattata atacagagca tctcagaaaa tgcgtttt 31680  
 gcctcatctc tgctgttagg catcatggg gatatacttc tggcccaatt ttgttgtaa 31740  
 gttgccatag aagatgcgt ctcccttcc ttccctttt tctttcttct 31800  
 tttttttttt ttttattatg tagagacagg gtctctcgat atgttgccca ggctggccct 31860  
 5 gaactcctgg gctcaagcag ttctcttgc ttggccccc aaagtgtgg gattacaggc 31920  
 aagagccatt gcaccaggc ccttcttcc ttccctttt catcaacctgc catattccag 31980  
 gcacttaggaa taaatcatca agtaaataaa cggccctacc ctccctggca attataatgg 32040  
 ggaaaggttag ctaaaaacaa acaaaaaat ctttccatt taaccatcg tgaataacaa 32100  
 aataccccca aacgttagtgg tggaaaaca caaccttta attttatgt tctgtgagtc 32160  
 10 aggaatttggc gcaggattgg tggatctg cttcatgtat aactggagcc aaaaatgaac 32220  
 tagctggaa acgtggagat ggagggggggg ggcattcaagg gccatataatc taaggctgg 32280  
 ggttgggtttt gtgggtttt aatagtgtcc tccaaatggg atatatgtt aagttctagc 32340  
 ccctggatcc ttttgcgttgc accttattttt gaaataaaat ctttgcataat gtaatttact 32400  
 tttttttttt ttttgcgttgc tgctcgagac tgagtctcg tctgtcaccc aggctggagt 32460  
 15 gcagtggcat gatctcgat cactgttacc ttccacccctt ggggtcaagc gattctccct 32520  
 cctcaggcctc ccaagtagct gggattatag gacatgttca ccatggccag ctaattttt 32580  
 tattttcagt agggacgggg tttcaccatg ttggccaggc tgggtctcgaa ctccctgaccc 32640  
 caaatgatct gccacccatg cctcccaaaag tgctggatt ataggcatgg ggcactgcat 32700  
 cctggccaga ttttgcgttgc ttccaaatccc tggatctttt gcatgtgact ttattttggaa 32760  
 20 ataagggtggg tttttttttt gttttttttt ttttttttga gacagttca ctttgcgtt 32820  
 caggctggag ttcagttgc taatctcagc tcactgaaac ctctgcctcc gaggctcaag 32880  
 cgatccccc gcctcgttcc cccgagtcac tgggactacg ggcacggcc accacacccg 32940  
 gctaattttt gcaatggggg tagagatggg gtttgcctt gttggccagg cggtctccaa 33000  
 ttggccaccat caagcaattt atccgcctcg gcctcccaaga gtgttgcgtt gataggtgt 33060  
 25 agccatggcg cccggccaga aagtcttgc agatttatggt gaattatgc ctaaatgttt 33120  
 ccatgcttag ttagagtggg ctccaaatcc aatgattgtat atgggtttt aaggagagat 33180  
 atttggagac atagccacag tcccaaggaa ggtggacatt ggaagacaga gtttagggatt 33240  
 agagtgtatgc agctacaacg caagaaatgg caaagatgc tggcgttcc tcagaagcaa 33300  
 aggagaggca aggaagggtt ctcccccgtt gactttttt ttttttttga agacggagtc 33360  
 30 tcactgctgt cagccatcgc tggtgttgc tggcgcgttcc tcggctact gcaacctct 33420  
 cctcccaatg tccagaaattt ctccctgcctc agccctccca gtaactgaga ttacaggcac 33480  
 cccggccaccat gctgtgttag tttttgcatt ttttagatgc atggattttt accctgttgg 33540  
 ccaggctgtt ctcgaactcc tgacctcgagg tgatccaccc gcctccggct cccaaagtgc 33600  
 tgggatttaca ggtgtcgttcc cccggagactt taaaagcatg gctttttttt tgacgtttt 33660  
 35 aaagcgtggc ttttccctgt agacttcaac accttgggtt tggacattta gatttcgaa 33720  
 ctgtgagaga acaaggtttctt agtgtgtgt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 33780  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 33840  
 tcaatctcggtt ctcactgcatttcc tcaatctcggtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 33900  
 tcccaagtagt ctggatttttttccatcagtttttttccatcagtttttttccatcagttttttt 33960  
 40 ttttgcgttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34020  
 gcctcaagtgc atatgccttc ctggccctcc caaagtgttgc ggattacagg tggatggcc 34080  
 cacacccatgc ctaaggtttctt gttgtgtgt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34140  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34200  
 tgcaagctcc gcctccgggg ttttccatcagtttttttccatcagtttttttccatcagttttttt 34260  
 45 actacaggca cccaccacca cggccatgttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34320  
 tcatacatgtt agccaggatg gtcctcgatct cctgacccatcg tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34380  
 cccgaatttgc tgggatttaca ggcattggcc accaaacccg gccaaggtttcc tttttttttt tttttttttt 34440  
 agccacccatgc ctttgcgttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34500  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34560  
 50 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34620  
 catggctcac tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34680  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34740  
 gagatggatgtt ctcactgtgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34800  
 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34860  
 55 atgatgtttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34920  
 aggcaggccctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 34980  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 35040  
 ctgaaacatc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 35100

cacagcatgg tggtctcagg gcagtagtac ttttacatgg caaccagctt ccccagagt 35160  
 agcgttctaa gattcagaaa gtgaaaaatg aaagtttctt aaaacttggt tccagaacat 35220  
 agcacagcaa aacttccacc acattctact ggtcaagca gtcacagagt cactcatatt 35280  
 caagaggcag aagtacagac ctcacttctt taagccacta cagtgcacagg tggtgatatg 35340  
 5 tcattagaga aagccctaaa caagaacctt gtcctcacc tgcccccaaa taccatggaa 35400  
 gatgtctttt tttttttttt ttttttttgg gggatagtct cactgtgtca tgcagtgtg 35460  
 tgatc 35465

10 <210> 57  
 <211> 14327  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 57  
 ggccggcgag cggggggctg cgggcggcgc ggagcgggagc ggcggagcg agcgagcgag 60  
 agagcggcgc gggccgggccc atgggggtggc gggcggccggc cgccgtctg ctggcgctgc 120  
 tgctgcacgg gcccgtctg gcccgtaccc atggggctgag ggcatacgtat ggcttgc 180  
 tgcctgagga catagagacc gtcacagcaa gccaaatgcgc ctggacacat tcgtaccc 240  
 20 ctgatgtatga gtacatgtctg gtcacagaca ttcaggaga cgacccggc agtggggacc 300  
 tgggcggcgg ggacttccag atgggttatt tccggccctt ggtgaattt actcgctcca 360  
 tcgactacag ccctcagctg gaggatgcag gtcacccggaga ttgcggagatgt 420  
 ctgtggtaga cacgtggag tcggatact tggaaattcc cggagaccat gttgtca 480  
 tggtgttcat caaggagctg gatggctggg tttttgtgg gtcgtatgtg ggctcgaa 540  
 25 ggaatgcgga tggtgcctcg attcaggaga tgcgtctcg ggtcatctcc agcggctctg 600  
 tggcctcta cgtcacctct ccccaaggat tccagttccg acgcctggc acagtgc 660  
 agttcccaag agcctgcacg gaggccgatg ttgcctgcac cagtcacat gagtgtgtgg 720  
 ccctggagta tcgctgtgac cggggccccc actgcaggaa catgtctgtat gagtcatt 780  
 gtgaggagcc agtccctgggt atcagccccca cattctctt cttgtggag acgacatctt 840  
 30 taccggcccg gccagagaca accatcatgc gacagccacc agtccaccac gtcctc 900  
 ccctgcttcc cgggtccgtc aggccccctgc cctgtggcc ccaggaggcc gcatgccca 960  
 atggggcaactg catccccaga gactacctct ggcacggaca ggaggactgc gaggacggca 1020  
 gcgatgagct agactgtggc ccccccgcac cctgtggagcc caacgagttt ccctgcggg 1080  
 atggacattt tgcctcaag ctgtggcgct ggcgtgtga ctttgactgt gaggaccgaa 1140  
 35 ctgatgtatgc caactgcccc accaagcgtc ctgaggaaatgtgcgggccc acacagtcc 1200  
 gatgcgtctc taccacatgc tgcattcccg ccagttccca ctgtgacgag gagagcact 1260  
 tgcctgaccc ggcacggat tttggctgca tgcctccca ggtgtgaca cttccccggg 1320  
 agtccatcca ggctttccgg ggcacggatc tgacccatccatgcctggcc attggcgatcc 1380  
 ccaccccccattt catcaatttttgg aggtcaact gggccacat cccctctcat cccagggtga 1440  
 40 cagtgaccag cgagggtggc cgtggcacac tgcgtatcccg tgcgtgtgaag gagtcagacc 1500  
 aggggtgccta cacctgttag gccatgaacg cccggggcat ggtgtttggc attcctgacg 1560  
 gtgtccttgc gtcgtccca caacggggcc cctgccttgc cggccacttc tacctggagc 1620  
 acagcggccgc ctgcctgcggc tgcgtctgtcttggcatcac cagcgtgtgc cagagcaccc 1680  
 ggcgttcccg ggaccagatc aggtgcgtctt gtcaccaacc cgtgacttc aagggtgtga 1740  
 45 atgtgacaat gcctgcgcag cccggcacgc caccctctc ctccacgcgc ctgcagatcg 1800  
 acccataccct gcacgagtcc cagcttagtag acctgtcccg cccgttccctc gtccacgcact 1860  
 cttctggggc tctgcctgaa cagttccctgg gcaacaaggat ggactcttat ggcggctccc 1920  
 tgcgttacaa cgtgcgtac gagttggccc gtggcatgtt ggagccatgt cagcggccgg 1980  
 acgtggcttcccg cgtgggtggc ggttaccggcc tccctcccg agggccacaca cccacccaa 2040  
 50 ctgggtctct gaaccagcgc cagggtccatgt tctctgagga gcaactgggtc catgagtctg 2100  
 gcccggccggc gcagcgcgc ggcgtgtgc aggtgcgtca gggctggag ggcgtgtca 2160  
 tccagaccgt gtacaacacc aagatggctt ggcgtggact tagcgcacatc gccatggata 2220  
 ccaccgtcac ccatgccacc accatggcc gtcggccacag tggggaggag tgcagatgcc 2280  
 ccattggctt tctggcttgc tccgtcgaga gtcgtgtatgc ccacttact cgggtgcctg 2340  
 55 gtggggcccta cctggccacc tgcctctgggtt gcaatgtca tggccatgcc agtcctgtg 2400  
 accctgtgtt tggccactgc ctgcattgttca agcacaacac ggagggccca cagtgcacaca 2460  
 agtgcaaggc tggcttctttt gggacgcca tgaaggccac ggcacttcc tgcggccct 2520  
 gcccctggccc atacatcgat gctcccgca gattctcaga cacttgcctc ctggacacgg 2580

atggccaagg cacatgtgac gcctgtgcc caggctacac tggccggc ttttgcgtt 2640  
 gtccccccgg atacgaggggc aaccccatcc agcccgccgg gaagtgcagg cccgtcaacc 2700  
 agagattgt gcgctgtgac gagcgtggca gcatggggac ctccggggag gctgtccct 2760  
 gtaagaacaa tgggtgggg cgcttgcata atgaatgtgc tgacggctct ttccacctga 2820  
 5 gtacccgaaa ccccgatggc tgctcaagt gcttcgtcat gggtgtcagt cggccactgca 2880  
 ccagctttc atggagccgt gcccagggtgc atggggctc tgaggagcct ggtcaacttca 2940  
 gcctgaccaa cgccgcaagg acccacacca ccaacgagg catctctcc cccacgccc 3000  
 gggaaactggg attctctcc ttcacagac tcttatctgg accctacttc tggagcctcc 3060  
 10 cttcacgctt cctggggac aagggtgacct cctatggagg agagctgcgc ttacacgtga 3120  
 cccagaggtc ccagccggc tccacacccc tgacggggca gcggtggtg gtgtgcaag 3180  
 gtaacaacat catcctagag caccatgtgg cccaggagcc cagcccccggc cagcccagca 3240  
 ccttcattgt gccttcggg gagaagcat ggcagcggcc cgatgggcag ccagccacac 3300  
 gggagcacct gctgtggca ctggcaggca tcgacacccct cctgateega gcatectacg 3360  
 15 cccagcggc cgtcgagac aggtctctg gcatcagcat ggacgtggct gtgcccggagg 3420  
 aaacccggcca ggacccggcg ctggaaagtgg aacagtgtc ctgcccaccc gggtaaccgtg 3480  
 ggccgtctcg ccaggactgt gacacaggct acacacgcac gcccgtggc ctctacctgg 3540  
 gtacctgtga acgctgcgc tgccatggcc actcagaggc ctgcagcca gaaacagggtg 3600  
 cttcgccagg ctggcagcat cacacggagg gcccctggtg tgagcagtgc cagccaggat 3660  
 actacggggc cggccaggcg gggacaccac aggactgcca gctgtcccc tgcatacgag 3720  
 20 accctgtgc cggccaggct gcccacaccc ttttctgg aacagacggc caccaccc 3780  
 gtgatgcgtg ctccccaggc cacagtggg gtcactgtga gaggtgcgc cttggctact 3840  
 atggcaaccc cagccaggcc cagccatgcc agagagacag ccagggtCCA gggcccatag 3900  
 gctgcaactg tgaccccaa ggcagcgtca gcagccagt tgatgtctgt ggtcagtgc 3960  
 agtgcaggc ccaggttagaa ggcttcactt gcagccactg cggccccac cacttccacc 4020  
 25 tgagtgccag caacccagac ggctgcctgc cctgtttctg tatggcata acccagcagt 4080  
 gcccagctc tgcttacaca cggccacccat tttccacca ctttgcctt ggggacttcc 4140  
 aaggcttgc cttggtaac ccacagcgaa acagccgcct gacaggagaa ttcactgtgg 4200  
 aacccgtgcc cgaggggtcc cagctcttt ttggcaactt tgcccaactc gcccattgagt 4260  
 cttctactg gcagctgccc gagacatacc agggagacaa ggtggccggc tacgggtggg 4320  
 30 agttgcata caccctctcc tacacagcag gcccacagg tagtggcctc ccagccagcg ctgcaggggcc 4380  
 atgtgcata cacggcaac aacatcatgc atcatgttcc gagaggatt ctggccggg cccatgggc 4440  
 cagagaggag gagctacagag atcatgttcc cactggccga cttggatgag ctctgtatcc 4500  
 agccggccac acgcgagcac ctccctgtcc acaacgcgc agggagatc tgccatcgcc 4560  
 gggccacgtt ctccctgtc ccgttgggtgg ccagcatcg cgcagtcgc ctggagggtcg 4620  
 35 cccagccggg gcccctaaac agaccccgcg ccctcgaggt ggaggagtgc cgctggcccg 4680  
 caggctgtcc tggcaggact gtggccccc ctacacgcgc accggggatg 4740  
 ggctctactt cggccactgc gagctatgtg aatgcaatgg ccactcagac ctgtgccaacc 4800  
 cagagactgg ggcctgtcg caatgccagc acaacgcgc agggagatc tgccatcgcc 4860  
 gtggccctgg ctactacggat gatgccacag cgggacgc tgaggactgc cagccctgtg 4920  
 40 cctggccactt gaccaacccca gagaacatgt tttccgcac ctgtgagac ctggggaggcc 4980  
 gcggttaccc ctgcacggcc tgcaaccccg gctacactgg ccagtactgt gaggcgttg 5040  
 gcccaggta cttggtaac cccagctgtgc aagggggcca gtgcctgcca gagacaaacc 5100  
 aagccccact ggtggtcag gtccatctg ctgcagcat agtgcacccaa ggtggctccc 5160  
 actccctgcg gtgtcagggtc agtggggagcc caccacca tttctattgg tccctgtgagg 5220  
 45 atggggccggc tggcccccgg ggcacccacg agcgcacatca aggtcccgag ctccacttcc 5280  
 ccagcgttca gcccctggat gctggggctt acatggcactt ctggcgtaat ctccaccaat 5340  
 ccaataccag cggggcagag ctgttgcata ctggggctcc aagcaagccc atcagatgt 5400  
 ctgtggagga gcagcggagc cagacgtgc gcccggagg tgacgtcacc ttcatctgca 5460  
 cagccaaaag caagtttttca gcttatacccg tgggtggac ccgcctgcac aacggggaaac 5520  
 50 tggccaccccg agccatggat ttcaatggca ttctgaccat tgcacacgtc cagctgagtg 5580  
 atgcaggcacttacatgtgtgc accggcttca acatgtttgc catggaccag ggcacagcca 5640  
 ctctacatgt gcagggctcg ggcacccctt gggcccccgt ggtctccatc catccggccac 5700  
 agctcagat gcagccccggg caactggcgag agtcccgctg cagcccccaca gggagcccc 5760  
 55 cggccacccctt caggtggaca gggggccccc gggcccaactt ccctgcaag gcaaaaaatcc 5820  
 acggcggcat cctgcgcctg ccagctgtcg agcccaacgg tcaaggccat tacttgc 5880  
 gagccacccat cagcgttgggg cagcgggtgg ccacccatgg tcaaggccat tacttgc 5940  
 gtggggcccg agtccaatgt agcccaagaga ggacccatgg ccacgcggc cggaccgtca 6000  
 ggctgtactt cagggctgca ggcgtccata ggcacccat caccctggagg aaggaagggg 6060

gcagcctccc accacaggcc cggtcagagc gcacagacat cgcgacactg ctcatccag 6120  
 ccatcacgac tgctgacgcc ggcttctacc tctgcgtggc caccagccct gcagggactg 6180  
 cccaggcccc gatgaagt gttgtccctt cagcctcaga tgccagccca cgggggtca 6240  
 agattgagtc ctcatcgcc tctgtgacag aaggcAAC actcgaccc aacttgttgg 6300  
 5 tggcagggtc agcccatgcc caggtcacct ggtacaggcg agggggtagc ctgcctcccc 6360  
 acacccaggt gcacggtcc cgtctgccc tcccccaaggct ctcaccagct gattctggag 6420  
 aatatgttg ccgtgtggag aatggatcg gccccaaaggga ggctccatt actgtgtctg 6480  
 tgctccacgg cacccattct ggccccaggct acacccaggc gcccggcage accccggcca 6540  
 tccgcatega gccccttcc tacacacgtgg cggaaaggcga gaccctggat ctgaactgcg 6600  
 10 tggtgccccc gcagggccac gcccaggta cgtggcacaa gcgtgggggc agcctccctg 6660  
 cccggcacca gaccacggc tcgctgctgc ggctgcacca ggtgaccccg gccgactcag 6720  
 gcgagttatgt gtgcctatgtg gtgggcacct cggccccctt agaggcctca gtcctggta 6780  
 ccatcgaage ctctgtcata cctggacccca tccccactgt caggatcgag ttttcatctt 6840  
 ccacagtggc cgagggccag accctggatc tgagctgcgt ggtggcaggc caggccccacg 6900  
 15 cccaggtcac atggtacaag cgtggggca gcctccctgc cggcaccag gttcgtggct 6960  
 cccgcctgta catctccag gcctcacctg cegatgcggg acagtacgctc tgccgggcca 7020  
 gcaacggcat ggaggcctcc attacggta cagtaactgg gaccagggg gccaacttag 7080  
 cctaccctgc cggcagcacc cagccccatcc gcatcgagcc ctccctctcg caagtggcgg 7140  
 aaggcagac cctggatctg aactgcgtgg tgccccggca gtcccatgcc caggtcacgt 7200  
 20 ggcacaagcg tggggcagc ctccctgtcc ggcaccagac ccacggctcc ctgctgagac 7260  
 tctaccaagc gtccccccgc gactcggggg agtacgtgtg ccgagtgtt ggcagctccg 7320  
 tgcctctaga ggcctctgtc ctggtaacca ttgagctgc gggctcagt gctgcacttg 7380  
 gggtaaccccc cacggtccgg atcgagtcat cgtttcgca agtggccgag gggcagaccc 7440  
 tggacctgaa ctgcctcggt gctggtcagg cccatgcccc ggtcacgtgg cacaagcgcg 7500  
 25 ggggcagcc cccggccccg caccaggta atggctcgag gtcacgcctg ctccagggtga 7560  
 cccagctga ttcaggggg tacgtgtgcc gtgtggtcgg cagctcaggat acccaggaag 7620  
 cctcagtcct tgcaccatc cagcagcggc ttagtggctc ccactccctg ggtgtggcgt 7680  
 accccgtccg catcgagtc tccctcagcct ccctggccaa tggacacacc ctggacctca 7740  
 actgcctgtt tgccagccag gtcffffccca ccatcacctg gtataagcgt ggaggcagct 7800  
 30 tacccagccg gcaccagatc gtgggcctcc ggctgeggat ccctcagggtg actccggcag 7860  
 actcgggca gtacggtgt cacgtcagta acggtgccagg ctcccccggg acctcgctca 7920  
 tgcgtcaccat ccaggccage ggttccccc acgtgcccag cgttccccc ccatcgagg 7980  
 tcgagtcgtc tttccccccacg gtgggtggaa ggcagaccc ggtatcgaa tgcgtggcgt 8040  
 ccaggcagcc ccaggtatc atcacatgtt acaagecggtt gggcagccct ccctcccgac 8100  
 35 accagccccca tggctccac ctgcgggtgc accaaaatgtc tggctgtac tggggcgagt 8160  
 atgtgtgccc gggcaacaac aacatcgatc ccctggggcctc atctccgtct 8220  
 cccctagcgc cggcagcccc tcccccctgc cagtcctccat gcccacatcata tttggatcgat 8280  
 cctcctcaca cgtggccgaa ggggagaccc tggatctgaa ctgcgtggc cccggccagg 8340  
 cccatgccccca ggtcacatgg cacaagcggtg gggcagccct cccacttcac catcagaccc 8400  
 40 ggggctcacc gtcgggtgtt caccatgtt cccggccga ctgggtgaa tacgtgtgcc 8460  
 ggggtatggg cagctctggc cccctggagg ctcagtcctt ggtcacccatc gaagcctctg 8520  
 gctcaagtgc tgcacatgtc cccggccccag gtggagcccc acccatccgc atcgagccct 8580  
 cctcctcccg agtggcagaa gggcagaccc tggatctgaa tgcgtggc cccggccagg 8640  
 cccacgccccca ggtcacatgg cacaagcggtg ggggagaccc cccatccatc catcagaccc 8700  
 45 acggcccact gtcgggtgtt aaccagggtt cccggctga ctctggcgag tactcgtgcc 8760  
 aagtgaccgg aagctcaggc accctggagg catctgtctt ggtcacaatt gagccctcca 8820  
 gcccaggacc cattctgtct ccaggactgg cccagccat ctacatcgag gcctcccttt 8880  
 cacacgtgac tgaaggcag actctggatc tgaactgtgtt ggtggccggg caggccccatg 8940  
 cccaggtcac gtggtaacag cggggggcga gcctccccc cccggcaccag acccatggct 9000  
 50 cccagctcgc gtcacatgtc gtcccccctg ccactcagg cgagtatgtg tgcgtggcag 9060  
 ccagcggccc aggccccatgg caagaaggctt cttcacatgtt cccaggcccg cccagggtt 9120  
 ggttccatcta ccgcctttagg agccccgtca tccatcgatc cccggccaggc agcaccgtgc 9180  
 agcaggccca ggtatcgccgc ttcaagtgcc tcatccatga cggggcagcc cccatcgacc 9240  
 tcgagttggaa gaccggaaac caggatgtgg aggacaaatgtt ccacatcgat cccatggct 9300  
 55 ccatcatcac catcggtggc accccggccca gcaaccacgg tacatccatgc tgcgtggcct 9360  
 ccaatgccta cgggtgtggcc cagagtgtgg tgaacatcgat tgcgtacggg cccctacag 9420  
 tgcgtggatcccccggccccc cccgtgtgggg tggaaatgtgg aaaggctgtc accctggagt 9480  
 gtgtcagtgc cggggagccccc cgtccctctg ctcgttggac ccggatcagc agcaccctcg 9540

5 ccaagttgga gcagcggaca tatgggctca tggacagcca cgccgtgctg cagatttcat 9600  
cagctaaacc atcagatgcg ggcacttatg tgcgttgc tcagaatgca ctaggcacag 9660  
cacagaagca ggtggagggt atcggtggaca cgggcggcat ggcccaggg gcccctcagg 9720  
tccaagctga agaagctgag ctgactgtgg aggctggaca cacggccacc ttgcgtgtc 9780  
cagccacagg cagcccccg cccaccatcc actggccaa gctgcgttcc ccactgcct 9840  
ggcagcaccg gctggaaagg gacacactca tcataccccc ggtagcccag caggactcgg 9900  
gccagtacat ctgcaatgcc actagccctg ctgggcacgc tgaggccacc atcatccgtc 9960  
acgtggagag cccaccat gcccacagg tcccgagaca cgcttcggc cagggagggg 10020  
agacgggtca gctccagtg cttggctcacc ggacacccccc actcaccc tcgtggagcc 10080  
gcgtgggcag cagcccttcc gggagggcga cggccaggaa cgagctgtc cactttgagc 10140  
10 gtgcagcccc tgaggactca ggcgcctacc gctgcgggtt caccacaag gtgggctcag 10200  
cegaggcctt tgcccgatgt ctcgtccaa gcccctccgg ctctctccct gcaccccttca 10260  
tcccgagg gtcacccccc accgtgcagg tcacgcctca gctagagacc aagagcattg 10320  
gggcaggcgt tgagttccac tgcgtgtgc ccagcggaca ggttacccag ctccgttgg 10380  
15 tcaaggaagg gggtcagtg ctcggggc acagcgtgca ggatggggt ctccgaaatcc 10440  
agaacttggc ccagagctgc caagggacgt atatatgcca ggcacatggc ctttgggg 10500  
aggcccaggc cagtgcctc ctggttatcc aagccctgcc ctcgggtcctc atacacatcc 10560  
ggacctctgt gcagaccgtg gtggttggcc acgcccgtgaa gtccaatgc ctggacttgg 10620  
gtgaccccaa gcctcagggt acatggagca aagtggagg gcaccccg ccaggcattg 10680  
20 tgcagagcgg aggtgtcgtc aggatgcgcc acgttagagct ggctgtatgc ggacagtatc 10740  
gctgcaactgc caccaacgca gtcggacca cacaatcccg cgtccctgtc ctgtgcaag 10800  
ccctgccccca gatctcaatg ccccaagaag tccgtgtgcc tgctgttct gcagctgtct 10860  
tcccctgtcat agcctcaggc tacccactc ctgacatcg ctggagcaag ctggatggca 10920  
gcctggccacc tgacagccgc ctggagaaca acatgtgtat gtcgcctca gtcggacccc 10980  
25 aggacgcagg tacctacgtc tgacccggca ctaaccggcca gggcaagggtc aaagcccttg 11040  
cccacctgca ggtgcccagg cgggtgggtc ctcacttcc acgacccccc tactcttcc 11100  
taccgtgtcc caccatcaag gatgcctaca ggaagtttca gatcaagatc accttccggc 11160  
ccgactcagc egatggatg ctgcgttaca atgggcagaa gcgagtccca gggagcccc 11220  
ccaaacctggc caaccggcag cccgacttca tcccttccgg ctcgtgggg ggaaggcccc 11280  
30 agttccgggt cgatgcaggc tcaggcatgg ccaccatccg ccatcccaca ccactggccc 11340  
tggggccattt ccacccgtg accctgtcgc gcagccctac ccagggttcc ctgtattgtgg 11400  
gtgacctggc cccggtaat gggacctccc agggcaagtt ccagggtctg gatctgaac 11460  
aggaactcta cctgggtggc tattctgtact atggtgcctat ccccaaggcg gggctgagca 11520  
gcggcttcat aggctgtgtc cgggagctgc gcatccaggg cgaggagatc gtcttccat 11580  
35 acctcaaacct cacggccgac ggcacatccc actgccccac ctgtcgggac cggccctgccc 11640  
agaatggcg tcaagtccat gactctgaga gcagcagtcgta ctcgcgttcc tgccctgtc 11700  
gcttcacccgg gagccgtgt gggccacgcg gggccctgtc acgggtcgagg ctacacctgc ctcgtccacc 11760  
ggcccgacgc cacctgtgtg aaccggcctg tgggttgcgg tggtaggaag gtgtgacatgt gaccaccccc 11820  
40 tggggccgtc ggggttgcgg tggtaggaag tcacctggca ctggccggcc tcaccaaac acaccacgag 11880  
gtgctggctc acgtggagtt caagccactc gcccctgacg ggttccctgtc ttcaagccgg gggaaagagcc 11940  
ggcctgtgga ggacttctgt tccctggcga tggggccgg ccacccctgg gggccctgtc 12000  
agttgggggtc agggctggcc gttctggcga ggcggagcc gctggccctg ggccgtggc 12060  
accgtgtgtc tgcagagcgt ctcaacaagg acggcagct ggggtgaat ggtggacgc 12120  
45 ctgtgtcgcc tccctcgccc ggcggacggc agggcctca ctcgcacacc ctgcttacc 12180  
tgggggggtgt ggagcccttc gtggcactgt gggccggcc caacatgagc gtcacttcc 12240  
gcggctgtgt gggcgagggt tcagtgaatg gcaaacggct ggaccccttcc tacagtttcc 12300  
taggcagcca gggcatcggt caatgtatg atgtccccc atgtgagcc ctcgcgttcc 12360  
aacatgtgtc cacgtgtcatg cccgctggcg agtatgagtt ccagtgcctg tgcgtatgt 12420  
50 gattcaaagg agacccgtgt gggccggcc ggcggacggc agaaccctg ccagccctgt gaaccctgtc 12480  
tgcattgggg cacctgtcc ggcacccggc gcccctgtc ccctggcttc tctggccac 12540  
gctgccaaca aggctctggc catggcatag caggtccga ctggcatctt gaaggccaggc 12600  
ggggcaatga tgccctggg cttttccca cttttccca cttttccca cttttccca 12660  
tccctggcca tgcgttctcc aggacccctgc cccgaggtgca cttttccca cttttccca 12720  
55 ttccggccac gacccgtgt gggccggcc ggcggacggc gggccggcc gggccggcc 12780  
gccaaggccaa ggacttcattc agccctgggc ttcaagacgg gcaccccttca ttcaggttacc 12840  
agctgggttag tggggaggcc cgcctgggtct ctggaggacc catcaatgac ggcgagttggc 12900  
accgggtgac agcactgcgg gggccggca gaggttccat ccaactgcgac ggttggagg 12960  
55 ttccggccac gacccgtgt gggccggcc ggcggacggc gggccggcc gggccggcc 13020

tggtcagcgg ccggccccca ggtcccaacg tggcagtcaa cgccaaggc agcgtctaca 13080  
 tcggcgagc ccctgacgtg gccacgctga cgggggcag attctcctcg ggcacatcacag 13140  
 gctgtgtcaa gaacctggtg ctgcactcg cccgaccgg cggcccgccc ccacagcccc 13200  
 tggacctgca gcaccgcgc caggccgggg ccaacacacg cccctgcccc tcgttaggcac 13260  
 5 ctgcctgccc cacacggact cccggccac gccccagccc gacaatgtcg agtataattat 13320  
 tattaatatt attatgaatt ttgttaagaa accgaggcga tgccacgctt tgctgctacc 13380  
 gccctggct ggactggagg tggcatgcc accctcacac acacagctgg gcaaaggccac 13440  
 aaggctggcc agcaaggcag gttggatggg agtgggcacc tcagaaagtc accaggactt 13500  
 ggggtcagga acagttggctg gttggggcca gaactgcccc cactgtcccc ctacccaccc 13560  
 10 atggagcccc cagatagagc tgggtggct gtttctgcag cccttggca gttctactc 13620  
 ctaggagagc caacccctggc ttgtggctg gtccccaca gctacctgag acgggcacatcg 13680  
 caggagtctc tgccacccac tcaggattgg gaattgtctt tagtgcggc tggagca 13740  
 aaggcagctc accccctggc aggccgtccc catccccacc agctcgcccc tcagcaccccc 13800  
 15 caccaccc caccagcccc ctggcacctc ctctggcaga ctccccctcc taccacgtcc 13860  
 tcctggctg cattccacc ccctcctgcc agcacacacg ctggggtccc tccctcaggg 13920  
 gctgttaaggg aaggccccacc ccaactctta ccaggagctg ctacaggcag agcccagcac 13980  
 tgataggccc ccccccaccg gccccccccc accccaggcc acatccccac ccatctgaa 14040  
 gtgaaggccc agggactctt ccaacagaca acggacggac ggatgcccgt ggtgctcagg 14100  
 aagagctagt gccttaggtg ggggaaggca ggactcacga ctgagagaga gaggaggggg 14160  
 20 atatgaccac cctgccccat ctgcaggagc ctgaagatcc agctcaagtg ccatcctgcc 14220  
 agtggccccc agactgtggg gttgggacgc ctggcctctg tgtcctagaa gggaccctcc 14280  
 tgtggtctt gtcttattaa acgggtctat ccccgcc 14327

25 <210> 58  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 58  
 Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly  
 1 5 10 15

35 <210> 59  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 59  
 Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly  
 1 5 10

45 <210> 60  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 60  
 Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser  
 1 5 10 15

55 Phe Ser

5 <210> 61  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 61  
Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala Leu Arg Val Ala Val  
1 5 10 15

15 <210> 62  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 62  
Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu  
1 5 10 15

25 <210> 63  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 63  
Glu Lys Met His Glu Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro  
1 5 10 15

35 Gly

40 <210> 64  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 64  
Asp Leu Gln Asn Phe Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu  
1 5 10

50 <210> 65  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 65  
Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu  
1 5 10 15

Leu Val Arg

5 <210> 66  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 10 <400> 66  
 ttywsntggg ayaaytgytt ygarggnaar gayccngcng tnathmgn 48  
 15 <210> 67  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 67  
 taywsnytnc cnaarwsnga rttygcngtn ccngayytn arytncn 48  
 25 <210> 68  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 68  
 30 Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg  
     1                 5                           10                   15  
 35 <210> 69  
 <211> 585  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40 <400> 69  
 gaygcncnc gncartaygg ncgtayttc caygaygayg gnttaytngc nttyccnggn 60  
 caygtnttww snmgnwsnyt ncngargtn ccngaracna thgarytnga rgtnmgnacn 120  
 wsnaacngcnw snggnytnty nytntggcar ggngtngarg tnggngargc nggncarggn 180  
 aargaytta thwsnytngg nytncargay ggnccayytn tnttymgnnta ycarytnggn 240  
 45 wsngggngarg cnmgnytngt nwsgargay ccnathaayg ayggngartg gcaymgngr 300  
 acngcnytnm gngarggnmg nmgnnggnwsn mgncargtng ayggngargaa rytngtwnsn 360  
 ggnmgnwsnc cnggncncaa ygtngcngtn aaygcnaarg gnwsngtnta yathggngn 420  
 gcncncngayg tngcnaacnyt naclnggnngn mgnntywsnw snggnathac nggntgygt 480  
 50 aaraaytng tnytncayws ngcnmgnccn ggngcncnc cncncarcc nytngayyt 540  
 carcaymngng cncargcngg ngcnaayacn mgncntgyc cnwsn 585  
 <210> 70  
 <211> 597  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 70

atgaartggg tntgggcnyt nytnytnyt gcngcntggg cngcngcnga rmgnngaytgy 60  
 mngtnwsnw snntymngt naargaraay ttygayaarg cnmgnttyws ngnacntgg 120  
 taygcnatgg cnaaraarga yccngarggn ytntyytnc argayaayat htngcngar 180  
 ttysngtng aygaracngg ncaratgwsn gcnaacngcna arggnmngt nmgnnytnytn 240  
 5 aayaaytggg aygtntgygc ngayatggtn ggnacnnty a cngayacnga rgayccngcn 300  
 aarttyaara tgaartaytg gggngtngcn wsnttyytnc araarggnaa ygaygaycay 360  
 tgathgtng ayacngayta ygacntay gcngtncart aywsntgymg nytnytnaay 420  
 ytnngayggnna cntgygcnga ywsntaywsn ttgtnttyw snmgngaycc naayggnytn 480  
 ccnccngcngcncaraarat hgtmgnrcar mgncargarg arytnytyt ngcnmgnrcar 540  
 10 taymgnytua thgtncayaa yggntaytgy gaygggnmgnw sngarmgnnaa yytnytn 597

<210> 71  
<211> 579  
15 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 71  
atgcarwsny tnatgcargc nccnytnyt athgcnytng gnytnytnyt ngcnacnccn 60  
20 gncncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgytty 120  
garggnaarg ayccngcngt nathmgnwsn ytnacnytng arccngaycc nathgtngtn 180  
ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnaclnwsn tnccnytnws nwsnccnytn 240  
aargtngayy tngtngtngta raargargtn gcnggnytnt ggathaarat hccntgyacn 300  
25 gaytayathg gnwsntgyac nttiyarcay ttgtgygag ytnngayat gytnathccn 360  
acnggngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggn ytnccntgyca ytgyccntty 420  
aargarggnna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygeng tnccngayyt ngarytnccn 480  
wsntggytyna cnacngnnaa ytaymgnath garwsngtyn tnwsnwsnws ngnnaarmgn 540  
579 ytnngtgya thaarathgc ngcnwsnyt aarggnath

30 <210> 72  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

35 <400> 72  
Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
1 5 10 15

40 <210> 73  
<211>  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 73

50 MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHILKKPSQ  
LSSFSWDNCD EGKDPAVIRS LTLEPPIVV  
PGNVTLSVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV  
AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLJP  
TGEPCPEPLR TYGLPCHCPL KEGTYSLPKS  
EFVVPDLELP SWLTTGNYRI ESVLSSSGKR  
LGCIIKIAASLKGI

<210> 74  
<211>  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

&lt;400&gt; 74

10

**GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQUALVE  
HVKEECDRLG PGMAICKNY ISQYSEIAIQ  
MMMHMQDQQP KEICALVGFC DEV**

15

<210> 75  
<211>  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens

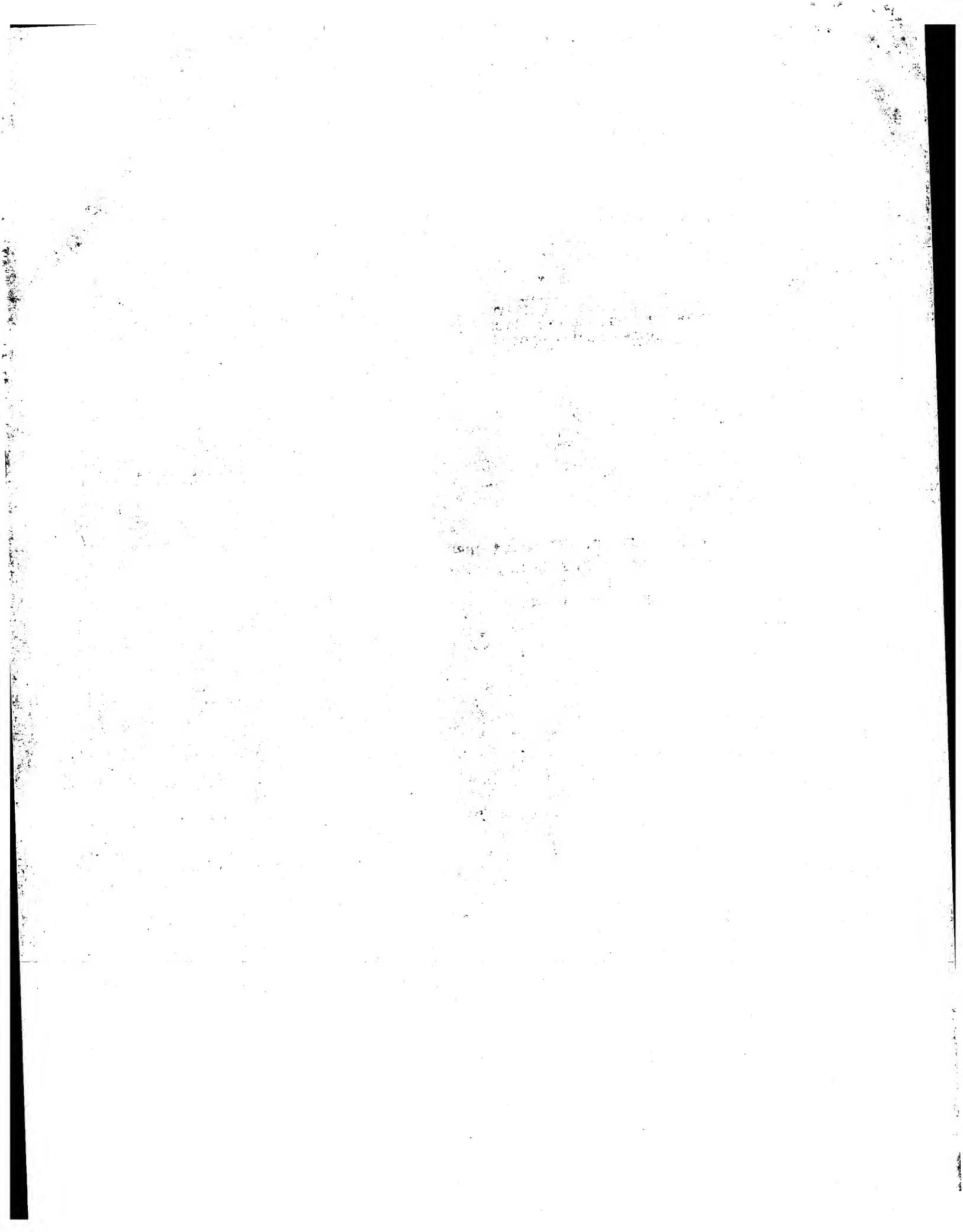
&lt;400&gt; 75

25

**MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD  
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE  
HIMEDDLTN ADKQLSFEF IMLMARLTWA  
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP**

30

35



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/05422 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**G01N 33/68. 33/564. C07K 14/47. A61K 38/17**

(21) Numéro de la demande internationale :  
**PCT/FR00/02057**

(22) Date de dépôt international : 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt : **français**

(26) Langue de publication : **français**

(30) Données relatives à la priorité :  
**99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR**

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
**BIOMERIEUX STELIHYS [FR/FR]**: Chemin de L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ROECKLIN, Dominique [FR/FR]**; 14 Rue de la Paix, F-67500 Niederschaeffolsheim (FR). **KOLBE, Hanno [FR/FR]**; 6

Rue des Tuiliers, F-67204 Achenheim (FR). **CHARLES, Marie-Hélène [FR/FR]**; 3 Allée de la Lamperte, F-69420 Condrieu (FR). **MALCUS, Carine [FR/FR]**; 9 Rue des Ronzières, F-69530 Brignais (FR). **SANTORO, Lyse [FR/FR]**; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les Bains (FR). **PERRON, Hervé [FR/FR]**; 15 Rue de Boyer, F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **DIDIER, Mireille**; Cabinet Germain et Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (national) : AE. AG. AL. AM. AT. AU. AZ. BA. BB. BG. BR. BY. BZ. CA. CH. CN. CR. CU. CZ. DE. DK. DM. DZ. EE. ES. FI. GB. GD. GE. GH. GM. HR. HU. ID. IL. IN. IS. JP. KE. KG. KP. KR. KZ. LC. LK. LR. LS. LT. LU. LV. MA. MD. MG. MK. MN. MW. MX. MZ. NO. NZ. PL. PT. RO. RU. SD. SE. SG. SI. SK. SL. TJ. TM. TR. TT. TZ. UA. UG. US. UZ. VN. YU. ZA. ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH. GM. KE. LS. MW. MZ. SD. SL. SZ. TZ. UG. ZW), brevet eurasien (AM. AZ. BY. KG. KZ. MD. RU. TJ. TM), brevet européen (AT. BE. CH. CY. DE. DK. ES. FI. FR. GB. GR. IE. IT. LU.

*[Suite sur la page suivante]*

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre : UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PRÉVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatic protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saposin B.

A3

(57) Abrégé : Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune. ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatische de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

**WO 01/05422 A3**



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BE, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**Publiée :**

*avec rapport de recherche internationale*

**(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:** 28 février 2002

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02057

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 G01N33/564 C07K14/47 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL) 2 March 1999 (1999-03-02) column 28; claim 17 & EP 0 667 354 A 16 August 1995 (1995-08-16) claim 5 & WO 95 21859 A cited in the application ---	1-21, 40, 51-62
X	WO 97 33466 A (BIO MERIEUX ; RIEGER FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR); BENJELLOUN N) 18 September 1997 (1997-09-18) cited in the application claims ---	1-21, 40, 51-62 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C: Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2001

Date of mailing of the international search report

08.02.2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte  
onal Application No  
PCT/FR 00/02057

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 08 308582 A (KAO CORP) 26 November 1996 (1996-11-26) the whole document ---	23
A	RIEGER F ET AL: "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 319, no. 4, 1 April 1996 (1996-04-01), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 abstract ---	1-21, 40, 51-62
A	KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NATURE MEDICINE, US, NATURE PUBLISHING, CO, vol. 1, no. 2, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 143-148, XP000611547 ISSN: 1078-8956 the whole document ---	1-21, 40, 51-62
A	WO 90 07712 A (BISSENDORF PEPTIDE GMBH) 12 July 1990 (1990-07-12) page 2 ---	1-21, 40, 51-62
A	WO 98 11439 A (BIO MERIEUX ; PERRON HERVE (FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDR) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document ---	1-21, 40, 51-62
A	CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA) 30 April 1999 (1999-04-30) the whole document -----	1-63

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 00/02057

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

After review as per PCT Rule 40.2(e), no fee is to be refunded.

- 1  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  

22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 00 A2057

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-21, 40, 51-62 (partly)

Perlecan polypeptides involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 1, 2, 69).

2. Claims: 1-21, 40, 51-63 (partly)

Polypeptides precursor of the retinol-binding plasmatic protein involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. Claims: 22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides precursor of the GM2 ganglioside involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. Claims: 1-21, 40-44, 46-63 (partly)

Polypeptides calgranulin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 17-23, 43-52).

5. Claims: 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides saposin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. Claim: 64

Use of lycorin.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte onal Application No

PCT/FR 00/02057

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 5876954	A	02-03-1999		FR 2716198 A AU 701972 B AU 1815295 A CA 2142557 A EP 0667354 A FI 954876 A WO 9521859 A JP 2803910 B JP 8511808 T NO 954081 A NZ 281260 A US 5728540 A		18-08-1995 11-02-1999 29-08-1995 16-08-1995 16-08-1995 13-10-1995 17-08-1995 24-09-1998 10-12-1996 13-12-1995 27-05-1998 17-03-1998
WO 9733466	A	18-09-1997		FR 2745974 A AU 2165897 A CA 2221028 A EP 0825811 A JP 11512623 T		19-09-1997 01-10-1997 18-09-1997 04-03-1998 02-11-1999
JP 08308582	A	26-11-1996		NONE		
WO 9007712	A	12-07-1990		NONE		
WO 9811439	A	19-03-1998	EP	0925504 A		30-06-1999
CA 2214843	A			NONE		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°  
PCT / FR 00 / 02057

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE IPC 7 G01N 33/68, G01N 33/564 C07K 14/47 A61K 38/17			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la (CIR)			
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) IPC 7 G01N C07K			
Documentation consultée au que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche			
Base de données électroniques consultées au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal			
C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS			
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n°. des revendications visées	
X	US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL) 2 mars 1999 (02.03.99) colonne 28; revendication 17 & EP 0 667 354 A 16 août 1995 ( 16.08.95) revendication 5 & WO 95 21859 A cité dans la demande	1-21, 40, 51-62	
X	WO 97 33466 A (BIO MERIEUX; RIEGER FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR); BENJELLOUN N ) 18 septembre 1997 (18.09.97) cité dans la demande revendications	1-21, 40, 51-62	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
° Catégorie spéciale de documents cités :			
"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent		"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		"&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée			
Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée 30 janvier 2001 (30.01.01)		Date d'expédition du rapport de recherche 08 février 2001 (08.02.01)	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen Brevets n° de télécopieur		Fonctionnaire autorisé n° de téléphone	

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale n°  
PCT / FR 00 / 02057

C. (suite). DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
Catégorie°	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n° des revendications visées
X	JP 08 308582 A (KAO CORP) 26 novembre 1996 (26.11.96) le document en entier	23
A	RIEGER F ET AL : "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCE DE LA VIE, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Vol. 319, no. 4, 1 avril 1996 (01.04.96), pages 343-350, XP000602023 ISSN: 0764-4469 Abrégé	I-21, 40, 51-62
A	KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE" NATURE MEDICINE, US, NATURE PUBLISHING, CO, Vol. 1, no. 4, 1 février 1995 (01.02.95), pages 143-148, XP0611547 ISSN: 1078-8956 Le document en entier	I-21, 40, 51-62
A	WO 90 07712 A (BISSENDORE PEPTIDE GMBH) 12 juillet 1990 (12.07.90) page 2	I-21, 40, 51-62
A	WO 98 11439 A (BIO MERJEUX ; PERRON HERVE (FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDOR) 19 mars 1998 (19.03.98) Le document en entier	I-21, 40, 51-62
A	CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA) 30 avril 1999 (30.04.99) Le document en entier	I-63

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**Demande internationale n°  
PCT/FR 00/02057**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
  
3.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

**voir feuille supplémentaire**

Après réexamen selon la Règle 40.2(e) PCT,  
aucune taxe additionnelle n'est à rembourser.

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s  
22-39 complet, 1-21 and 40-63 en partie
  
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s \_\_\_\_\_

**Remarque quant à la réserve**

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.  
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-21, 40, 51-62 en partie

Polypeptides perlecans être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 1, 2, 69).

2. revendications: 1-21, 40, 51-63 en partie

Polypeptides précurseur de la protéine plasmatique de liaison de rétinol être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. revendications: 22-39 complet; 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. revendications: 1-21, 40-44, 46-63 en partie

Polypeptides calgranuline B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No.17-23, 43-52).

5. revendications: 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides saposine B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. revendication : 64

Utilisation de la lycorine

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02057

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5876954 A	02-03-1999	FR 2716198 A AU 701972 B AU 1815295 A CA 2142557 A EP 0667354 A FI 954876 A WO 9521859 A JP 2803910 B JP 8511808 T NO 954081 A NZ 281260 A US 5728540 A	18-08-1995 11-02-1999 29-08-1995 16-08-1995 16-08-1995 13-10-1995 17-08-1995 24-09-1998 10-12-1996 13-12-1995 27-05-1998 17-03-1998
WO 9733466 A	18-09-1997	FR 2745974 A AU 2165897 A CA 2221028 A EP 0825811 A JP 11512623 T	19-09-1997 01-10-1997 18-09-1997 04-03-1998 02-11-1999
JP 08308582 A	26-11-1996	NONE	
WO 9007712 A	12-07-1990	NONE	
WO 9811439 A	19-03-1998	EP 0925504 A	30-06-1999
CA 2214843 A		NONE	